



UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DE LISBOA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL

ANÁLISE DO PAPEL DO H₂O₂ NA
REGULAÇÃO DA ACTIVAÇÃO DO NF-κB

TERESA ALEXANDRA DOMINGUES DA SILVA
MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR HUMANA

2008



UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DE LISBOA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL

**ANÁLISE DO PAPEL DO H₂O₂ NA
REGULAÇÃO DA ACTIVAÇÃO DO NF-KB**

TERESA ALEXANDRA DOMINGUES DA SILVA
MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR HUMANA

2008

DISSERTAÇÃO DE TESE DE MESTRADO
ORIENTADA PELA PROFESSORA DOUTORA LUÍSA CYRNE

**GRUPO DE BIOQUÍMICA DOS OXIDANTES E ANTIOXIDANTES, DEPARTAMENTO DE
QUÍMICA E BIOQUÍMICA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DE LISBOA**

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Summary	v
Lista de abreviaturas.....	vi
I. Introdução	1
I.1. Constituição do NF- κ B: estrutura e função	1
I.2. A família das proteínas I κ B	2
I.2.1. Os I κ B β e I κ B ϵ	3
I.2.2. I κ B β	5
I.2.3. I κ B ϵ	6
I.3. Vias sinalizadoras do NF- κ B	7
I.4. Indução da degradação das proteínas inibitórias	8
I.4.1 Indução da degradação das proteínas inibitórias pelo TNF- α	8
I.4.2 Indução da degradação das proteínas inibitórias pelo H ₂ O ₂	9
II. Objectivos	10
III. Material e métodos	11
III.1. Reagentes	11
III.2. Linhas celulares e cultura de células	11
III.2.1 Manutenção/passagem de células	12
III.3. Condições para o estabelecimento do estado estacionário (s.s.) de H ₂ O ₂	12
III.3.1. Actividade do glucose oxidase	13
III.3.2. Ensaio de consumo pelas células intactas; adição do H ₂ O ₂ em s.s.	13
III.4. Determinação dos níveis de I κ B β , I κ B ϵ e c-Rel por <i>Western blot</i>	14
III.4.1. Extracção de proteínas	14
III.4.2. Doseamento de proteína	15
III.4.3. Análise das proteínas por electroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)	15
III.4.4. Electrotransferência de proteínas	15
III.4.5. <i>Western blot</i>	15
III.4.6. Tratamento de resultados das imagens obtidas por <i>Western blot</i>	16
III.5. Análise estatística	16
IV. Resultados e discussão	17
IV.1. Calibração das condições de estabelecimento do estado estacionário	17
IV.1.1. Actividade do glucose oxidase	17
IV.1.2. Consumo de peróxido de hidrogénio por células intactas	17
IV.2. Determinação dos níveis de I κ B β e I κ B ϵ por <i>Western blot</i>	18
IV.2.1. Optimização das condições do <i>Western blot</i> ; titulação dos anticorpos	18
IV.2.2 Estudo da degradação do I κ B β e I κ B ϵ nas células HeLa tratadas com 10 ng/ml TNF- α	20

IV.3. Estudo da degradação do I κ B β e I κ B ϵ nas células HeLa e MCF-7 tratadas com 0,37 ng/ml TNF- α	21
IV.4. Estudo da degradação do I κ B β e I κ B ϵ nas células HeLa e MCF-7 tratadas com 25 μ M de H ₂ O ₂ em estado estacionário	23
IV.5. Estudo da degradação do I κ B β e I κ B ϵ nas células HeLa e MCF-7 tratadas com 0,37 ng/ml TNF- α e com 25 μ M de H ₂ O ₂ em estado estacionário.....	25
IV.6. Determinação dos níveis de c-Rel nas células tratadas com H ₂ O ₂ , TNF- α e com H ₂ O ₂ + TNF- α por <i>Western blot</i>	27
V. Conclusões	28
VI. Bibliografia	31
VII. Anexo I	i

Agradecimentos

À Professora Luísa, por me ter permitido realizar este trabalho, e também pelo apoio, confiança e conhecimento transmitidos.

À Virgínia, pela confiança e por se ter mostrado sempre tão disponível.

Ao Grupo de Bioquímica dos Oxidantes e Antioxidantes, nomeadamente o Fernando, a Susana e a Ana Matias, pelo contributo tão útil.

Ao Márcio, pelo incondicional apoio e infinita paciência.

Resumo

O factor de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) é responsável pela activação de diversos genes relacionados com o sistema imune e a resposta inflamatória, pelo que foi considerado preponderante na defesa do organismo. Os seus indutores mais comuns são o factor de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina 1 (IL-1). O envolvimento de espécies reactivas de oxigénio (ERO) na indução do NF- κ B tem sido largamente estudado, contudo, permanecem dúvidas sobre o significado fisiológico deste indutor. Mais recentemente, tornou-se objecto de investigação a possibilidade do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (uma das principais ERO na célula) ter um efeito modulador na activação do NF- κ B.

Este trabalho centrou-se essencialmente no estudo do papel do H_2O_2 na activação do NF- κ B, através de duas subunidades inibitórias do NF- κ B, as subunidades I κ B β e I κ B ϵ , em células HeLa e MCF-7, na tentativa de elucidar uma possível função fisiológica por parte deste agente. Utilizaram-se doses de H_2O_2 relativamente baixas – 25 μ M – mantidas em estado estacionário (s.s.) durante o tempo de exposição às células. A activação do NF- κ B foi seguida através da análise da degradação do I κ B β e do I κ B ϵ , tendo sido realizada uma análise comparativa dos níveis de cada um desses I κ Bs nas fracções citosólicas, em células tratadas com o TNF- α , o H_2O_2 e os dois agentes em simultâneo; nestas condições, foram também analisados os níveis nucleares da proteína c-Rel, que é uma das subunidades constituintes do factor NF- κ B.

Nas células HeLa o H_2O_2 induz um ligeiro aumento da subunidade inibitória I κ B β aos 60 e 120 minutos, ao contrário do que acontece com a subunidade I κ B ϵ , que não apresenta uma variação significativa dos seus níveis ao longo de 4 h de tratamento. Os níveis de c-Rel também não sofrem variações induzidas pelo H_2O_2 nestas condições experimentais. No entanto, quando estas células são tratadas com H_2O_2 e TNF- α simultaneamente, o H_2O_2 vai modular a acção do TNF- α , observando-se uma indução da subunidade I κ B ϵ aos 45 min de tratamento, com uma correspondente diminuição dos níveis da c-Rel.

Nas células MCF-7 o H_2O_2 induz uma degradação das subunidades I κ B β e I κ B ϵ aos 90 min e aos 120 min, respectivamente, e um aumento da translocação da subunidade c-Rel para o núcleo. Quando as células são tratadas com H_2O_2 e TNF- α simultaneamente, o H_2O_2 vai actuar como um modulador positivo na indução da expressão da subunidade I κ B ϵ e na translocação de c-Rel para o núcleo. Assim, podemos concluir que a subunidade c-Rel deverá estar ligada a outra subunidade inibitória, para além das subunidades I κ B β e I κ B ϵ .

A partir destes resultados pode concluir-se que o H_2O_2 , por si só, não tem um papel relevante na indução do NF- κ B, mas pode actuar como um modulador da acção do TNF- α . Este efeito modulador pode ser positivo ou negativo, dependendo do tipo de célula.

Palavras-chave: NF- κ B, I κ B β , I κ B ϵ , H_2O_2 , efeito modulador.

Summary

Nuclear factor κ B (NF- κ B) is responsible for activating innumerable genes related to immune system, including the inflammatory response, having a major role defending the organism. The most common inducers of this transcription factor are the cytokines tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin 1 (IL-1). Reactive oxygen species are thought to be involved in this process, but their physiological importance remains unclear. Here we explore the possibility that hydrogen peroxide (H_2O_2) (one of the most common ROS in cells) has a modulatory effect in activating NF- κ B.

The present work focused on the study of the activation of NF- κ B by H_2O_2 in two epithelial cell lines, HeLa and MCF-7 cells, by measuring the cytosolic levels of two of its inhibitory subunits, the $I\kappa B\beta$ and the $I\kappa B\epsilon$, in an attempt to elucidate its possible physiological role.

Constant concentrations (steady state) of H_2O_2 were delivered into the cells by a calibrated method that mimicks the endogenous production of H_2O_2 . The studies were conducted by measuring the degradation level of $I\kappa B\beta$ and $I\kappa B\epsilon$, after exposing cells to TNF- α , H_2O_2 and both inducers simultaneously. It was performed a comparison between the cytosolic levels of those subunits and it was also measured the nuclear level of c-Rel, one of the components of NF- κ B.

In HeLa cells, H_2O_2 induced a slightly increase of $I\kappa B\beta$ at 60 and 120 minutes treatment, unlikely $I\kappa B\epsilon$, which shows no alteration along the four-hour treatment. In our experimental conditions, c-Rel levels also do not show any changes. However, when cells are treated with both TNF- α and H_2O_2 simultaneously, H_2O_2 modulates the TNF- α effect, by inducing $I\kappa B\epsilon$ at 45 minutes treatment, corresponding to a decrease in c-Rel levels.

In MCF-7, H_2O_2 induces degradation of both $I\kappa B\beta$ and $I\kappa B\epsilon$ at 90 and 120 minutes treatment, respectively, and an increase in the nuclear translocation of c-Rel to the nucleus. Therefore, we inferred that c-Rel must be attached to another inhibitory subunit besides $I\kappa B\beta$ and $I\kappa B\epsilon$.

With these results we conclude that H_2O_2 alone does not have an important role in NF- κ B induction, but modulates TNF- α effect. This modulatory effect may be negative or positive, depending on the cell type.

Key-words: NF- κ B, $I\kappa B\beta$, $I\kappa B\epsilon$, H_2O_2 , modulatory effect.

Lista de abreviaturas

AZT – Azidotimidina
BSA – Albumina de Soro Bovino
CD40 – Receptor molecular na superfície das células B maduras
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
D-PBS – Tampão de fosfatos salino de Dulbecco
DTT – Ditioneitol
DTPA - Ácido dietilenotriaminopentacético
ECL – Quimioluminescência aumentada
EDTA – Ácido etileno diamino tetracético
ERO – Espécie reactiva de oxigénio
FBS – Soro fetal de bovino
H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio
HEPES – Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
IL – Interleucina
I κ B – Subunidade inibitória do factor nuclear κ B
IKK – Cinase dos I κ B
LPS – Lipopolissacárido
NEMO – Modulador essencial do factor nuclear κ B
NF- κ B – Factor nuclear κ B
NIK – Cinase indutora do factor nuclear κ B
NES – Sequência de exportação nuclear
NLS – Sequência de localização nuclear
PBS – Tampão de fosfatos salino
PEST – Domínio das I κ B rico em prolina, glutamato, serina e treonina
PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
PI – Iodeto de propídeo
PKA – Cinase de proteína A
PMA – Acetado de forbol miristato
PSA – Persulfato de amónio
RHD – Domínio de homologia das proteínas Rel
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – Electroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
s.s. – Estado estacionário
TAD – Domínio de transactivação

TEMED – *N,N,N,N*-Tetrametiletilenodiamina

TNF- α – Factor de necrose tumoral

Tris – Tris-hidroxilmetilaminometano

I. Introdução

O factor nuclear κB (“*nuclear factor kappa B*”) foi descrito pela primeira vez em 1986, por Sen e Baltimore¹, tendo a sua denominação provindo quer da sua localização – células B – quer da sua ligação à região *enhancer* do gene que codifica para a imunoglobulina κ .

O NF- κB é um factor de transcrição que revelou responder a estímulos que actuam na resposta imunológica, como o TNF- α , IL-1, LPS ou activadores das células T, resultando uma relação estrita com o sistema imune e a resposta inflamatória, o que levou a atribuir-se ao NF- κB um papel preponderante na defesa do organismo¹. No entanto, o interesse sobre este factor de transcrição eucariota aumentou devido a estudos que indicam que o NF- κB pode ser activado por uma enorme quantidade de estímulos, tais como bactérias, fungos e vírus mas também citocinas inflamatórias, *stress* oxidativo e alguns agentes quimioterapêuticos, como por exemplo taxol, doxorubicina, vincristina, AZT, fenobarbital, temoxifen, entre outros². Os genes alvo do NF- κB são muito variados e desempenham papéis celulares importantes na sobrevivência celular e proliferação, bem como na resposta inata e adaptativa, tornando assim o NF- κB crucial na fisiologia e patologia celulares. Este factor de transcrição é essencial numa resposta imune adequada a diversas condições de *stress* ambiental mas em condições em que a sua actividade está aumentada pode causar inflamação crónica e cancro³.

I.1 Constituição do NF- κB : estrutura e função

O NF- κB é um complexo proteico dimérico, formado por homo ou heterodímeros. As subunidades que o constituem fazem parte de uma família de proteínas estruturalmente relacionadas, globalmente designadas por proteínas Rel/NF- κB (Fig.1).

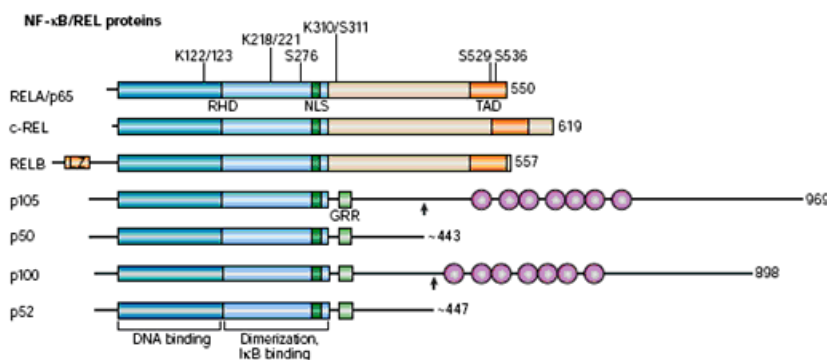


Figura 1 – Representação esquemática dos diversos membros da família Rel/ NF- κB .

À direita está indicado o número de aminoácidos. Também são indicados os presumíveis locais de hidrólise na p100 (a.a. 447) e na p105 (a.a. 433) e os locais de

fosforilação e ubiquitinação. Apenas RelA, c-Rel e RelB possuem domínios de transactivação (TAD) na extremidade C-terminal. A p105 e a p100 contêm repetições de anquirina (círculos cor-de-rosa), bem como regiões ricas em glicina (GRR). O fecho de leucinas (LZ) existente em RelB é necessário para a transactivação de RelB⁴.

Fazendo parte desta família encontram-se identificados e caracterizados cinco membros: NF- κ B1 (p50 e o seu precursor p105), NF- κ B2 (p52 e o seu precursor p100), p65/RelA, c-Rel e RelB. Estas subunidades podem associar-se em dímeros com diferentes combinações, havendo associações preferenciais que poderão ser específicas do tipo de células. A forma mais frequente do complexo NF- κ B é o heterodímero p50-p65⁵.

Todas as proteínas Rel contêm uma região N-terminal (cerca de 300 resíduos de aminoácidos) conservada, denominada domínio de homologia Rel (RHD)^{5,6}. A porção N-terminal do RHD é responsável pela estrutura e contacto com a sequência específica de ligação do factor, o local κ B. A sequência de *consensus* de ligação do NF- κ B é: (5'GGGRNNYYCC3') (R= A ou G, N= qualquer base, Y= C ou T), embora o NF- κ B também se ligue a algumas sequências de DNA que partilham pouca semelhança com a região de *consensus*^{1,5}. A porção C-terminal do RHD medeia a dimerização com outros membros da família NF- κ B/Rel e permite a aquisição da estrutura física para a ligação aos I κ B⁴. Estas proteínas apresentam um sinal de localização nuclear (NLS) que é essencial para o transporte dos complexos de NF- κ B activos para o núcleo. O RHD de todas as proteínas Rel (excepto RelB) contém um local de fosforilação para a PKA a cerca de 25 a.a. do NLS na zona N-terminal. A fosforilação deste local deverá ser necessária para a localização nuclear das proteínas Rel e/ou poderá estar envolvida na actividade transcricional e ligação ao DNA⁷.

1.2 A família das proteínas I κ B

A descoberta de actividade latente de ligação do NF- κ B ao DNA na fracção citoplasmática de células HeLA e 70Z/3 e, além disso, a descoberta que poderia ocorrer inibição dessa mesma ligação, foi o ponto de partida para propor a existência de proteínas inibidoras da função NF- κ B – as proteínas I κ B - que poderiam ser inactivadas por indução da actividade do NF- κ B⁸.

A actividade do NF- κ B é finamente regulada pela interacção com as proteínas inibitórias da família I κ B. Estas interacções têm duas consequências funcionais: (a) o complexo NF- κ B/I κ B fica sequestrado no citoplasma e (b) os I κ Bs inibem a ligação do NF- κ B ao DNA. A família I κ B inclui o I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , Bcl-3, p100/I κ B δ , p105/I κ B γ e o I κ B-R que apresentam em comum múltiplas cópias de sequências de 30-33 resíduos de aminoácidos denominados por repetições de anquirina (Fig. 2). Para desempenhar a sua função o NF- κ B tem que ser translocado para o núcleo. As repetições de anquirina medeiam a interacção com as proteínas Rel, mascarando a sequência NLS, responsável pela translocação do complexo para o núcleo, e retendo o NF- κ B no citosol^{5,6}.

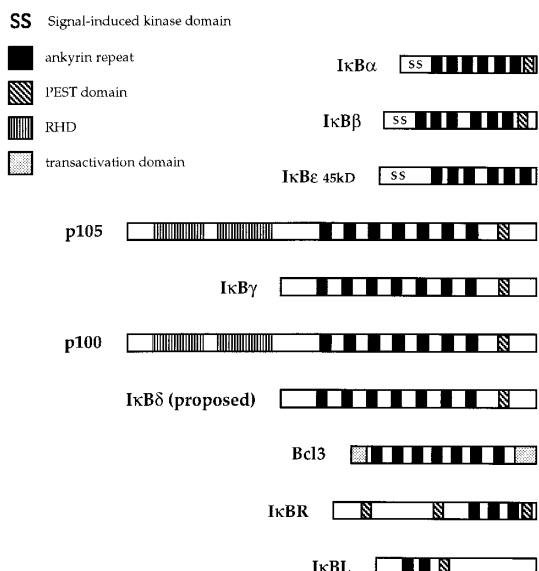


Figura 2 – Representação esquemática dos membros da família IκB de mamíferos.

As caixas pretas representam as repetições de anquirina; SS representa o par de resíduos de serinas que são fosforilados em resposta a um estímulo exterior, necessário para a degradação dos IκBα, IκBβ e IκBε. Encontram-se representados os domínios PEST C-terminal (caixas com riscos em diagonal), os domínios de homologia Rel (RHD) das p105 e p100 (caixas com riscos verticais) e o domínio de transactivação da Bcl-3 (caixa sombreada)⁹.

Em resposta a uma série de estímulos, as proteínas IκB sofrem uma fosforilação nos dois resíduos de serina na região amino terminal, que desencadeiam uma poliubiquitinação e degradação proteossômica dos IκB. A Bcl3 também contém repetições de anquirina e é frequentemente incluída na família IκB. Contudo, quando Bcl3 se liga à p50 ou à p52, estes novos complexos têm propriedades transcrpcionais activas devido à presença de um domínio TAD em Bcl3⁴.

A degradação do IκB é um evento cuidadosamente regulado que é iniciado por fosforilações específicas por IKK (“IκB kinases”) activados⁴. O IKK consiste num complexo de três proteínas: IKKα (IKK1), IKKβ (IKK2) e NEMO (*NF-κB essential modifier*, também designado IκBγ) correspondendo as duas primeiras às subunidades catalíticas e a última à subunidade reguladora necessária para a activação do complexo^{1,6,10}.

A interacção NF-κB-IκB melhor estudada é a do dímero p50/p65 com o IκBα. Esta interacção bloqueia a capacidade do NF-κB se ligar ao DNA. Daí resulta uma localização maioritariamente citoplasmática do complexo devido a um forte sinal de exportação do IκBα, ou seja, ocorre *shuttling* nucleocitoplasmático, mas a taxa de exportação é superior à de importação pelo que se considera que o complexo é citoplasmático. No caso do IκBβ, não ocorre o *shuttling* mencionado anteriormente pelo que o complexo está retido no citoplasma. Supõe-se assim a existência de interacções NF-κB-IκB diferentes³.

1.2.1 Os IκBβ e IκBε

Apesar de estruturalmente bastante semelhantes, os IκBα, IκBβ e IκBε exibem diferenças funcionais significativas *in vivo*. Dependendo da linha celular e do estímulo, estas proteínas inibitórias respondem de modo divergente aos sinais indutores do NF-κB¹¹. Ghosh *et al.* (1998) descreveram que, de um modo geral, o IκBα é degradado rapidamente, enquanto o

I κ B β e o I κ B ϵ são degradados com uma cinética mais lenta. A acrescentar a isto, sabe-se que a eficiência da inibição dos diferentes I κ B também é distinta^{11,12}.

Simeonidis *et al.*¹² contribuiu para a determinação da capacidade de inibição de cada uma das isoformas mencionadas. Assim, foi mostrado que a estrutura molecular da primeira repetição de anquirina do I κ B determina a força com que a proteína inibitória sequestra o NF- κ B no citoplasma, sendo que a função nuclear dos I κ B é determinada pela terminação carboxílica.

O I κ B β , com uma massa molecular de 45 KDa, interage na maioria com heterodímeros p50/p65 e p50/c-Rel^{11,13}.

O I κ B ϵ , com uma massa molecular de 51 KDa, parece estar preferencialmente complexado com homodímeros e heterodímeros de c-Rel e p65¹⁴. Como estes dímeros são diferentes no que diz respeito à especificidade de ligação ao DNA dos complexos NF- κ B clássicos, tudo indica que regulam um conjunto de genes que são distintos dos regulados pelas outras proteínas I κ B¹⁴. De facto, a sequência de DNA reconhecida pelo dímero c-Rel/p65 (5' HGGARNYYCC 3') é diferente da sequência habitualmente reconhecida pelos complexos p50/p65 (5'GGGRNNYYCC3') (R= A ou G, N= qualquer base, Y= C ou T, H=A, C ou T)¹⁵.

Partindo do conhecimento que o I κ B α é, relativamente ao I κ B β , um forte inibidor da actividade nuclear do NF- κ B, enquanto o I κ B ϵ entra no núcleo de forma ineficaz, e juntando a isto o pressuposto que o I κ B β e/ou o I κ B ϵ não podem substituir *in vivo* a função do I κ B α , importa determinar se existe uma função especializada para cada proteína inibitória *in vivo*, nomeadamente citoplasmática *versus* nuclear, ou se os seus efeitos particulares são unicamente causados pelas interacções específicas com o NF- κ B.¹²

Os I κ B β e I κ B ϵ são, comparativamente ao I κ B α , degradados mais lentamente. Estabeleceu-se que o I κ B β é responsável por uma resposta persistente dos indutores do NF- κ B¹³. As moléculas controladas pelo I κ B β escapam ao controlo do I κ B α através de um mecanismo particular: em células não estimuladas, o NF- κ B está associado a uma forma hiperfosforilada do I κ B β , enquanto em células estimuladas o NF- κ B associa-se a complexos que contêm uma forma hipofosforilada do I κ B β . Poderá assim dizer-se que a forma hipofosforilada do I κ B β actua como um *chaperone* que protege o NF- κ B do I κ B α , permitindo ao NF- κ B deslocar-se para o núcleo, onde a proteína inibitória será degradada ou dissociada do NF- κ B, após o que este se liga ao DNA.¹⁶

O I κ B ϵ , embora seja degradado lentamente, é re-sintetizado pouco depois e pensa-se que controla um outro tipo de resposta do NF- κ B, uma resposta lenta mas transiente. A expressão de I κ B ϵ é sobre-regulada após indução do NF- κ B e existam múltiplas isoformas fosforiladas em células não estimuladas¹⁴.

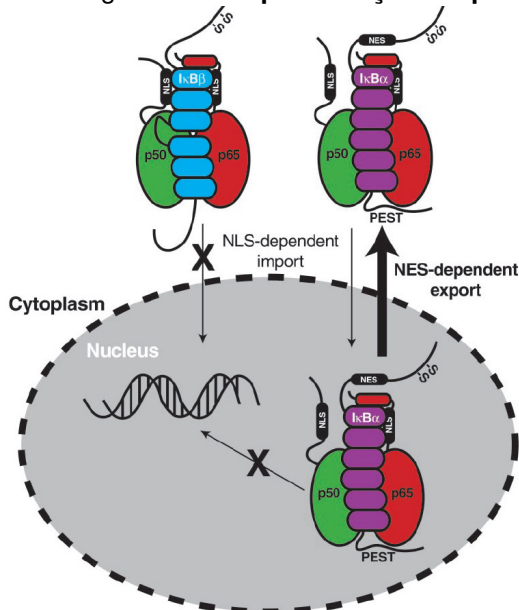
I.2.2 I κ B β

De estudos realizados com células pré-B e T murinas que pretendiam mostrar o efeito do TNF- α na cinética de degradação do I κ B β , ficou demonstrado que nalgumas destas linhas celulares não ocorria a sua degradação induzida por aquela citocina, enquanto noutras ocorria uma degradação lenta e sustentada¹⁷. Daí, pressupôs-se que poderia haver uma especificidade celular na degradação do I κ B β como resposta ao TNF- α . Foi observado também que ocorrem duas formas funcionais desta subunidade inibitória: uma forma maior, degradada progressivamente, e outra forma menor, que se acumula e parece ser resistente à degradação induzida pelo TNF- α . Estas duas formas estão associadas com o p65 e a menor não provém da maior, mas requer síntese proteica para se acumular.

O I κ B α e o I κ B β partilham algumas propriedades mas também exibem diferenças. Por exemplo, tanto um como o outro interagem com o mesmo espectro de proteínas Rel, inibem a ligação ao DNA e estão restritos em termos de distribuição ao citoplasma^{11,18}.

A diferença mais significativa entre o I κ B α e o I κ B β reside no facto deste último activar de modo persistente o NF- κ B dependendo do tipo de célula e de estímulo, sendo a regulação do NF- κ B pelo I κ B α rápida mas transiente.^{13,16,18} O papel funcional distinto de cada uma destas moléculas inibitórias surgiu em parte pelo facto do NF- κ B activo sobre-regular a expressão do I κ B α mas não do I κ B β . O I κ B α recém sintetizado pode entrar no núcleo e dissociar os complexos NF- κ B-DNA transcricionalmente competentes^{19,20}, inibindo assim a transcrição dos genes alvo (Fig.3).

Figura 3 – Representação esquemática do sequestro de NF- κ B inactivo pelo I κ B α e I κ B β .



Devido à sua capacidade para contactar ambos os NLS, o I κ B β (a azul) funciona como um inibidor citoplasmático dos dímeros de NF- κ B (representado pela subunidade p50 a verde e pela p65 a vermelho). O I κ B α (a magenta) contacta apenas o NLS do p65 do heterodímero p50/p65 e, como resultado, forma complexos nucleo-citoplasmáticos dinâmicos. A ligação ao DNA através do complexo nuclear NF- κ B-I κ B α é inibida devido às interações entre o domínio PEST e o NF- κ B, sendo o complexo rapidamente transportado para o citoplasma. Assim, em muitas células existem simultaneamente, pelo menos, dois *pools* de activadores transcripcionais inibidos²¹.

O I κ B β é um inibidor mais fraco da ligação DNA-NF- κ B em comparação com o I κ B α ¹⁸. Não se compreende bem como é que um inibidor tão fraco pode regular eficazmente a actividade

do NF- κ B. Nos seus estudos, Malek *et al*²¹ evidenciam a existência de uma energia crescente de ligação do I κ B β devido ao contacto de ambos os NLS do dímero de NF- κ B, ao contrário do I κ B α , que contacta apenas com um NLS (Fig.3).

Os complexos NF- κ B-I κ B β inactivos permanecem no citoplasma pois os dois NLS do dímero NF- κ B estão mascarados.

I.2.3 I κ B ϵ

Inicialmente descrita como uma proteína citoplasmática, veio a estabelecer-se mais tarde que o I κ B ϵ também circula activamente entre o núcleo e o citoplasma, tal como o I κ B α . O transporte para o núcleo é feito por intermédio das repetições de anquirina com uma eficiência de transporte menor relativamente ao I κ B α ; a exportação do I κ B ϵ é mediada por uma sequência NES localizada entre os resíduos de aminoácido 343 e 352²². Uma das possíveis funções desta molécula no núcleo seria a de comandar a exportação das proteínas NF- κ B/Rel para o citoplasma²⁰.

Em células não estimuladas, o I κ B ϵ existe como múltiplas isoformas, diferentemente fosforiladas, que formam complexos com homodímeros e heterodímeros de c-Rel e p65¹⁴.

Em termos moleculares, foram estabelecidas algumas diferenças entre o I κ B ϵ e as outras proteínas inibitórias mais comuns. Uma diferença entre o I κ B α /I κ B β e o I κ B ϵ reside no facto deste conter uma região N-terminal extensa que inclui uma região rica em resíduos de glicina, produto do processamento da p105.²³ Contrariamente aos I κ B α /I κ B β , o I κ B ϵ não contém na região C-terminal, relativamente às repetições anquirina, uma sequência PEST, normalmente implicada num rápido *turnover* das proteínas. Esta região é essencial para a degradação dos I κ B α /I κ B β em resposta a um estímulo externo. No entanto, uma pesquisa informática levou à identificação de uma possível região PEST no I κ B ϵ , mas na região N-terminal relativamente às repetições anquirinas. A ausência da sequência PEST na região C-terminal pode explicar a cinética lenta de degradação do I κ B ϵ ¹².

Spiecker *et al* (2000)²⁴ observaram que em células vasculares endoteliais esta proteína inibitória exibe uma degradação rápida comparativamente às outras proteínas inibitórias, ao contrário do que foi observado em células B e T, cuja degradação do I κ B ϵ é mais fraca e lenta comparativamente ao I κ B α ²⁵.

Em suma, o I κ B ϵ partilha com o I κ B β uma cinética de degradação mais lenta – em comparação com o I κ B α – e com o I κ B α , a re-síntese como resposta a certos estímulos, actuando como um auto-regulador da actividade do NF- κ B. Portanto, poderá dizer-se que o I κ B ϵ é responsável pelo controlo de um terceiro tipo de resposta deste factor de transcrição: uma resposta lenta e transiente.¹⁴

I.3 Vias sinalizadoras do NF- κ B

Em células não estimuladas, o NF- κ B está inactivo, complexado com o I κ B no citoplasma. Quando a célula recebe uma variedade de estímulos, o NF- κ B rapidamente entra no núcleo e activa a expressão dos genes alvo³. O processo geral de activação do NF- κ B já se encontra descrito: alguns eventos citoplasmáticos activam os IKK que, após fosforilação do complexo NF- κ B-I κ B, levam à degradação destas moléculas (a chamada via clássica de activação do NF- κ B)⁴ (Fig.4).

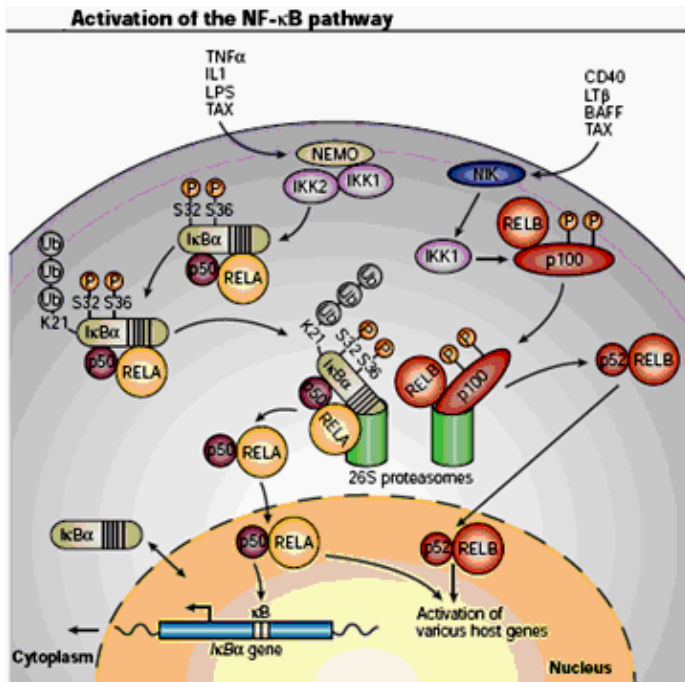


Figura 4 – **Vias de activação do NF- κ B:** esquema da via clássica (representada à esquerda no esquema) e da via não clássica (representada à direita no esquema) da activação do NF- κ B.

O tratamento de células com diversos indutores do NF- κ B induz uma cascata de sinais que culmina na fosforilação induzida dos I κ B em dois resíduos de serina situados no domínio regulador N-terminal. O heterodímero p50/p65 é translocado subsequentemente para o núcleo, activando a transcrição. Também é mostrado a retenção da p65 pela sua proteína precursora p105 que é processada proteoliticamente na p50⁴.

Segundo a via clássica, face a estímulos como o TNF- α , IL-1 β e LPS, o I κ B é fosforilado em dois resíduos de serina conservados no domínio N-terminal, Ser32 e Ser36 no I κ B α e Ser19 e Ser23 no I κ B β , pelos cinases IKK, tornando-o alvo de ubiquitinação (nas lisinas 21 e 22), seguido de degradação pelo proteossoma 26S (Fig. 4). A degradação do I κ B expõe a sequência NLS do NF- κ B permitindo a sua translocação para o núcleo.^{1,5,6,10}

Foi descrita uma via alternativa que envolve o processamento proteolítico induzido da p100, precursor do NF- κ B2 (p52). O CD40 e diferentes membros da superfamília dos receptores TNF, como por exemplo o factor de activação de células B (BAFF), activam selectivamente o cinase indutor de NF- κ B (NIK) e o IKK1. Após fosforilação da p100, segue-se a sua ubiquitinação e processamento proteolítico parcial pelo proteossoma 26S, originando-se a p52. É de realçar que esta via origina principalmente heterodímeros p52-RelB, em oposição aos heterodímeros p50-p65 produzidos na via clássica.⁴

Para além da fosforilação indutível a nível do I κ B, encontra-se descrita uma fosforilação constitutiva na região C-terminal no domínio PEST das proteínas^{1,26}. Esta fosforilação

reforça a importância do domínio PEST na função dos I κ B e sugere que esta possa constituir um pré-requisito para a fosforilação da porção N-terminal¹.

Também se encontra descrita uma via de activação do NF- κ B que não envolve a fosforilação das serinas referidas, mas sim a da tirosina 42 do I κ B α . Esta via parece ser desencadeada por estímulos diferentes do acima referido, englobando essencialmente agentes oxidativos.²⁶

I.4 Indução da degradação das proteínas inibitórias

Embora os I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ apresentem diferenças funcionais, que tal como se viu dependem do tipo de células e do estímulo envolvido, a degradação destas proteínas parece envolver um mecanismo semelhante⁹.

Como se disse atrás, o I κ B α é fosforilado nas serinas 32 e 36, tornando-o alvo de ubiquitinação nas lisinas 21 e 22, seguido de degradação pelo proteassoma 26S (Fig. 4). Todavia, e embora o I κ B β e o I κ B ϵ tenham resíduos de lisina nessas posições, não é absolutamente necessário que elas existam para haver ubiquitinação. O domínio PEST da região C-terminal das proteínas I κ B α e I κ B β parece ser também bastante importante para a ubiquitinação induzida por um sinal externo e posterior proteólise^{27,28}, embora alguns estudos recentes coloquem dúvidas nesta descoberta^{29,30}.

A degradação do I κ B ϵ ocorre por um mecanismo semelhante, pois a degradação induzida por um sinal externo é bloqueada quando o par de serinas correspondente é alterado para resíduos de alanina não fosforilados, e o pré-tratamento de células com inibidores do proteassoma 26S provocam acumulação de formas hiperfosforiladas do I κ B ϵ ¹⁴.

Há, contudo, algumas diferenças para o I κ B β . Embora a presença de um par de serinas intactas em N-terminal seja necessária para a indução da degradação desta subunidade, o pré-tratamento com inibidores de proteassoma não leva ao aparecimento de formas hiperfosforiladas. A ideia de que estas duas serinas estejam fosforiladas de forma constitutiva no I κ B β sugere a existência de um segundo sinal, não identificado, que torna esta proteína um alvo de degradação¹⁷.

I.4.1 Indução da degradação das proteínas inibitórias pelo TNF- α

Hoffmann *et al*³¹ descreveu em 2002, utilizando um modelo matemático, o metabolismo de regulação dos I κ Bs, de uma forma que reproduzia a activação do NF- κ B em resposta ao estímulo por TNF- α . Para isso, foram utilizados parâmetros computacionais baseados em modelos bioquímicos e, uma vez que não existia nenhum tipo de informação específica para todas as isoformas, assumiu-se que tanto o I κ B β como o I κ B ϵ mantinha os mesmos parâmetros medidos para o I κ B α . Para além de constatar que a dinâmica temporal do NF-

κ B tem como objectivo auxiliar o controlo da expressão de genes envolvidos na inflamação, compreende-se com estes estudos que as três isoformas combinam as suas funções de modo a permitir que o módulo de sinalização seja diferenciado entre estímulos curtos e persistentes. Estes dados obtidos a partir da modelação teórica foram confirmados experimentalmente pelos investigadores, utilizando para isso células MEF (*Mouse Embryonic Fibroblast*) normais e células mutantes para dois a dois dos I κ B (ikb β -/-, ϵ -/-; ikb α -/-, β -/-; ikb α -/-, ϵ -/-). O I κ B α , cuja expressão é induzida pelo NF- κ B, tem um papel de *feedback* negativo, permitindo uma rápida resposta *on-off* do NF- κ B, com um carácter oscilatório da actividade nuclear do NF- κ B; o I κ B β e o I κ B ϵ funcionam de modo a reduzir este comportamento oscilatório, estabilizando a resposta do NF- κ B durante estimulações mais longas³⁰.

Mais recentemente, avanços neste tipo de estudos com modelos matemáticos propuseram que a indução do I κ B ϵ é dependente do NF- κ B e que essa indução funciona como um atenuador da actividade do factor de transcrição e também como terminador da expressão génica³². Em conjunto com o I κ B α , é criado um mecanismo regulador de *feedback* negativo duplo, que visa o controlo da dinâmica da actividade do NF- κ B.

Relativamente ao I κ B β , foram obtidos diversos resultados contraditórios quando se provocou a indução com o TNF- α : em células Jukatt ele não foi activado¹³, em células T murinas ocorreu activação¹⁷, enquanto que em células de linfoma houve uma indução lenta e persistente³³. Uma explicação possível para estas observações, que é proposta por Weil¹⁷, é a de que o I κ B β possa ser induzido por outro tipo de estímulos como IL-1 ou PMA, em determinados tipos de células, comprometendo a via do receptor de TNF- α . Assim, o tipo de estímulo pode explicar como é que o I κ B α e o I κ B β , sendo alvo de degradação pela mesma via, tenham respostas diferentes.

1.4.2 Indução da degradação das proteínas inibitórias pelo H₂O₂

Tendo sido o H₂O₂ descrito inicialmente como um segundo mensageiro em diversas vias de activação do NF- κ B³⁴, foram efectuados alguns estudos em diversas linhas celulares, que se mostraram inconclusivos relativamente ao papel do H₂O₂ na activação do NF- κ B: em células HeLa o H₂O₂ activou o NF- κ B³⁵ enquanto que células monocíticas foram insensíveis a essa espécie reactiva de oxigénio³⁶.

Contudo, tornou-se plausível concluir que a activação do NF- κ B pelo H₂O₂ segue um mecanismo diferente do descrito para indutores clássicos como o TNF- α , sendo a primeira evidência a escala de tempo em que ocorre a activação, considerando-se a indução por esta citocina mais rápida do que a indução causada pelo H₂O₂³⁷. Com o avanço do conhecimento a nível do mecanismo, tornou-se imperativo conseguir atribuir um significado fisiológico ao

H₂O₂ na activação do NF-κB. É também conhecido o facto de em algumas células o TNF-α e a IL-1 levarem à produção de espécies reactivas de oxigénio³⁸, o que levou os investigadores a questionarem se o H₂O₂ teria uma função de modulador na activação do NF-κB ou se realmente seria um indutor *per si*.

O facto de alguns estudos sobre o papel do H₂O₂ na activação do NF-κB *in vivo* se revelarem contraditórios pode estar relacionado com as condições experimentais utilizadas, nomeadamente as condições em que o H₂O₂ é adicionado, assim como as concentrações deste indutor utilizadas. Com o objectivo de resolver esta questão e partindo da ideia-chave de que o H₂O₂ é continuamente produzido *in vivo* e permanece num estado estacionário, Antunes F. (2001)³⁹ desenvolveu um método de exposição das células a concentrações estacionárias de H₂O₂ ([H₂O₂]_{ss}). Este método de introdução de oxidante mimetiza a realidade fisiológica e pode fornecer resultados fiáveis quanto à dualidade de actuação resultante da activação NF-κB. Utilizando esta metodologia foi possível fazer estudos, adicionando concentrações baixas de H₂O₂ e de um modo contínuo, visto que as concentrações de H₂O₂ encontradas durante a inflamação variam entre 5 a 15 μM³⁷. Oliveira-Marques *et al*³⁷ ainda observou que o H₂O₂, numa concentração extracelular de 25 μM em estado estacionário, não induz significativamente a translocação do NF-κB para o núcleo, mas estimula esta translocação induzida pelo TNF-α, ou seja, o H₂O₂ tem um efeito modulador positivo – sinergismo – na referida activação, nas duas linhas celulares (HeLa e MCF-7) estudadas. No mesmo trabalho, foi ainda observado que, quando a concentração do H₂O₂ aumenta, deixa de existir este efeito estimulador, passando o H₂O₂ a desempenhar um papel de inibição na indução do NF-κB pelo TNF-α.

II. Objectivos

Este trabalho tem como objectivo o estudo da activação do NF-κB induzido pelo H₂O₂, numa situação em que o H₂O₂ é adicionado em concentrações relativamente baixas (25 μM), mantidas constantes durante o ensaio (adição do H₂O₂ em estado estacionário ([H₂O₂]_{ss}), que simulam uma situação que existe *in vivo*.

Tal como foi referenciado atrás³⁷, o H₂O₂ em condições de estado estacionário tem um papel modulador da activação do NF-κB pelo TNF-α. No trabalho mencionado, apenas foi determinado o papel do IκBα na regulação da activação do NF-κB. Dado que a localização nuclear do NF-κB é controlada nas células de mamíferos pelos três IκBs - IκBα, IκBβ e IκBε – importa determinar o papel que as subunidades IκBβ e IκBε podem desempenhar na activação do factor de transcrição NF-κB.

Neste trabalho pretende-se então estudar o papel específico que o $[H_2O_2]_{ss}$ poderá ter na activação do NF- κ B pelas subunidades I κ B β e I κ B ϵ . Por outro lado, é importante averiguar a relação das diferentes subunidades inibitórias e a importância relativa de cada uma delas sob acção do H_2O_2 . Assim, pretende-se fazer uma análise comparativa das fracções citosólicas de cada um dos I κ Bs, sendo cada ensaio efectuado em células controlo, células tratadas com TNF- α , com $[H_2O_2]_{ss}$ e com ambos os indutores.

Dado que a subunidade I κ B ϵ também se liga aos complexos p65/c-Rel, pretende-se avaliar o papel que o $[H_2O_2]_{ss}$ pode ter na activação deste complexo, avaliando os níveis de c-Rel na fracção nuclear, em cada uma das situações de indução atrás definidas.

Como modelo celular deste estudo foram escolhidas duas linhas celulares: HeLa, de carcinoma humano do colo do útero, e MCF-7, de adenocarcinoma humano da glândula mamária.

III. Material e métodos

III.1. Reagentes

O meio RPMI 1640, o soro fetal de bovino (FBS), a tripsina, a glutamina e os antibióticos, penicilina e estreptomicina, provieram da *Biowhitaker* (Verviers, Bélgica). Os marcadores de massa molecular para análise em SDS-PAGE e o kit ECL para revelação dos *Westerns blots* foram adquiridos à *Amersham Biosciences*. O piruvato, o glicerol, a acrilamida e o iodeto de propídeo (PI) foram obtidos à *Fluka*. O sulfato de dodecil de sódio (SDS) proveio da *GIBCO BRL* e as soluções de revelação e fixação à *Kodak*. O H_2O_2 , o metanol, o Tween 20 e a glicina provêm da *Merck*. O N,N,N,N, - Tetrametiletilenodiamina (TEMED) e o persulfato de amónio (PSA) foram obtidos da *Promega*. O etanol absoluto, o ácido ortofosfórico foram obtidos da *Riedel- de Haën*. Os anticorpos provieram de *Santa Cruz Biotechnology*: anti- I κ B β (sc-945), I κ B ϵ (sc-7156), c-Rel (sc-70) e anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase de rábano (sc-2004). O dimetilsulfóxido (DMSO), o catalase (fígado de bovino, EC 1.11.1.6), o glucose oxidase (*Aspergillus niger*, EC 1.1.3.4), Triton X-100, o TNF- α (recombinante humano expresso em levedura), o ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA), os inibidores de proteases, o fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), o ditiotreitól, (DTT), o Igepal CA630 (Nonidet p-40), o reagente de Folin, o Comassie Brilliant Blue G e a bisacrilamida foram obtidos da *Sigma*.

III.2. Linhas celulares e cultura de células

As linhas celulares HeLa (carcinoma do colo do útero humano) e MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano) foram obtidas de *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas,

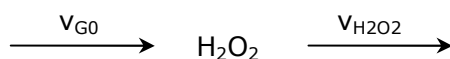
VA, EUA) e *European Collection of Cell Cultures* (ECACC, Salisbury Wiltshire, Reino Unido), respectivamente. Estas linhas celulares apresentam uma morfologia epitelial e crescimento aderente. Ambas constituem linhas celulares transformadas, pelo que se torna importante controlar o seu crescimento, evitando uma confluência elevada. Um crescimento persistente pode alterar as propriedades de origem das células. Como meio de crescimento utilizou-se o meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS), glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL, denominado por meio completo. As células foram incubadas a 37°C com 5% (v/v) CO₂ e 90% (v/v) humidade, numa incubadora Snijders CO190TC-20. O manuseamento das células foi efectuado numa câmara de fluxo laminar vertical Danlaf VFRS 1206. A visualização e contagem de células realizaram-se recorrendo a um microscópio de contraste de fase Olympus CK40.

III.2.1. Manutenção/passagem das células

As células foram distribuídas e mantidas em caixas de 100 mm. De modo a garantir que se mantinham em fase exponencial a substituição com meio fresco foi executada todos os 2-3 dias. Encontrando-se as células numa confluência abaixo dos 60-70% procedeu-se apenas à mudança de meio (aspiração e adição de meio pré-aquecido). Acima desta confluência foi necessário distribuir as células por mais caixas de Petri: passagem das células. Tratando-se de células aderentes, as células sofreram um tratamento com tripsina para ficarem em suspensão, permitindo a sua passagem e contagem quando necessário. Para a contagem de células actuou-se do seguinte modo: aspirou-se o meio e efectuou-se uma lavagem com 2mL de D-PBS (KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, NaCl 1,4 mM e Na₂HPO₄ 8,1 mM). Seguidamente adicionou-se 2 mL de solução stock de tripsina (0,25 g/L em PBS), incubando-se a caixa a 37°C durante 5 min. Passado esse tempo, as células foram recolhidas para um tubo de centrifuga, diluindo-se a tripsina com 4 mL de meio não suplementado, e procedeu-se à centrifugação a 900 g durante 5 min. O sedimento foi ressuspenso num volume de meio desejado, procedendo-se à contagem de células num hemocitómetro.

III.3. Condições para o estabelecimento do estado estacionário (s.s.) de H₂O₂

Quando se adiciona determinada concentração de H₂O₂ às células parte dele será consumido pelas mesmas através dos enzimas intracelulares, como por exemplo, a catalase. Nas condições experimentais utilizadas neste trabalho é necessário garantir que durante todo o tempo do ensaio a quantidade de H₂O₂ se mantém constante, tal como acontece na situação *in vivo*. Este estado estacionário de H₂O₂ é atingido adicionando glucose oxidase ao meio que, em quantidades bem definidas, contrapõe o consumo de H₂O₂ pelas células:



em que v_{G0} diz respeito à velocidade de produção de H_2O_2 pelo glucose oxidase e $v_{\text{H}_2\text{O}_2}$ à velocidade de consumo de H_2O_2 pelos enzimas da célula. Partindo do pressuposto que o consumo de H_2O_2 segue uma reacção de primeira ordem tem-se: $v_{\text{H}_2\text{O}_2} = k [\text{H}_2\text{O}_2]$, sendo k a constante de velocidade de consumo, de primeira ordem. Em condições de estado estacionário (s.s.):

$$-\frac{d\text{H}_2\text{O}_2}{dt} = 0 \Leftrightarrow v_{G0} = v_{\text{H}_2\text{O}_2} \Leftrightarrow v_{G0} = k [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{s.s.}} \Leftrightarrow [\text{H}_2\text{O}_2] = \frac{v_{G0}}{k}$$

Conjugando a concentração de H_2O_2 pretendida com a constante de velocidade de consumo pelas células HeLa ou MCF-7 (determinada experimentalmente) determinou-se a quantidade de glucose oxidase a adicionar ao sistema para se manter o s.s. De referir que o estado estacionário não é atingido de imediato, pelo que neste método se tem que adicionar inicialmente a concentração de H_2O_2 que se pretende manter estacionária.

III.3.1. Actividade do glucose oxidase

A actividade enzimática do glucose oxidase é definida como 1 unidade produz 1 μmol de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$ a pH 5,1 a 35°C . O frasco continha 1060 U/mL de solução. A determinação da actividade do enzima efectua-se segundo um método descontínuo e tendo em conta as condições utilizadas no trabalho experimental. Termostatizou-se o meio RPMI a 37°C (condições em que se encontram as células) que contém o substrato para o enzima (glucose). Adiciona-se glucose oxidase ao meio de modo a produzir aproximadamente 400 μM de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{hora}$ (volume reacional de 10 mL). Retira-se uma alíquota de 1 mL de 5 em 5 min, medindo-se a produção de H_2O_2 com o eléctrodo de oxigénio. A quantificação do H_2O_2 foi feita com auxílio de um eléctrodo de oxigénio (Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, U.K.) acoplado a um registador (Perkin-ELMER).

III.3.2. Ensaios de consumo pelas células intactas; adição do H_2O_2 em estado estacionário

Este ensaio permitiu determinar a constante de velocidade de consumo de H_2O_2 pelas células. A reacção iniciou-se com a adição de 100 μM de H_2O_2 , numa caixa com 10 mL de meio. O consumo de H_2O_2 foi seguido ao longo do tempo retirando-se alíquotas de 1 mL, até esgotar a sua presença.

Para a adição de H_2O_2 em estado estacionário, a concentração do H_2O_2 nas células foi medida usando um eléctrodo de oxigénio. Após o traçado de uma linha de base, com a

solução amostra no eléctrodo, adicionou-se aproximadamente 10 µL de catalase ~5mg/mL, de modo a converter todo o H₂O₂ presente em oxigénio, passível de ser medido. Nos ensaios que envolveram quantificação de H₂O₂ foi efectuada uma curva padrão cujas concentrações variaram entre os 15 e os 35 µM. A concentração real da solução de H₂O₂ utilizada foi confirmada através da sua absorvência a 240 nm ($\epsilon_{240\text{ nm}} = 43,4\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Quando a experiência foi efectuada na presença de H₂O₂ em estado estacionário, e após determinação de glucose oxidase e H₂O₂ a adicionar, foi realizado um teste (uma caixa de células extra) de modo a confirmar se o estado estacionário era mantido pois, dependendo dos dias, as células tinham respostas de consumo de H₂O₂ diferentes.

III.4. Determinação dos níveis de IκBβ, IκBε e c-Rel por *Western blot*

Os níveis das subunidades IκBβ, IκBε e c-Rel foram determinados por *Western blot* nas fracções proteicas citosólicas e nucleares, previamente separadas.

A contagem das células foi efectuada numa suspensão celular após tripsinização. As células foram contadas e semeadas em caixas de 100 mm 48 h antes do ensaio, de modo a ter por caixa 1,5 milhões de células/mL para HeLa e 1,9 milhões de células/mL para MCF-7, no dia da experiência. Após a substituição do meio uma hora antes do início da experiência, iniciou-se o ensaio, através da adição de H₂O₂ (em estado estacionário) ou de TNF-α. Findo o tempo do ensaio o meio foi aspirado; tratando-se de H₂O₂, confirmou-se inicialmente a concentração do H₂O₂ com o eléctrodo de oxigénio, para depois proceder à extracção das proteínas.

III.4.1. Extracção de proteínas

Após a aspiração do meio as caixas foram imediatamente colocadas em gelo, lavando-se duas vezes com PBS frio. Seguidamente adicionou-se 400 µL de tampão de lise (HEPES 50 mM pH 7,2, EDTA 2 mM, NaCl 10 mM e sacarose 250 mM), que mantém os núcleos intactos. No dia da experiência esta solução é suplementada com os inibidores de proteases (PMSF 1 mM, benzamidina 1,5 µg/mL, leupeptina 10 µg/mL, pepstatina 10 µg/mL), o DTT 2 mM e o Nonidet P-40 0,1% (v/v). Passados alguns segundos procedeu-se à recolha do extracto celular para um tubo *ependorf* com o auxílio de um raspador e adicionou-se novamente 100 µL de tampão de lise à caixa, para minimizar as perdas de material. Centrifugaram-se os extractos a 3000 g durante 4 min a 4°C, recolhendo-se o sobrenadante, com as proteínas citosólicas. Procedeu-se à lavagem do sedimento com 300 µL de tampão de lise e centrifugou-se novamente nas mesmas condições. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento com 30 µL de tampão de núcleos [HEPES 50 mM pH 7,2, EDTA 2 mM, NaCl 400 mM e glicerol 20% (v/v)] suplementado com a solução de inibidores. As amostras ficaram em gelo durante 20-25 min, efectuando 3 agitações no

vórtex. Centrifugou-se a 10 000 g durante 10 min, recolhendo-se o sobrenadante que continha a fracção proteica nuclear.

III.4.2. Doseamento de proteína

O doseamento de proteína foi feito segundo o método de Bradford ⁴⁰, usando como padrão uma solução de BSA; as proteínas citosólicas e nucleares foram diluídas para um volume final de 100 µL. A todos os tubos adicionou-se 1 mL de reagente de Bradford: Comassie Brilliant Blue Reagent G 250 0,01% (p/v), etanol 4,7% (v/v) e ácido fosfórico 8,5% (v/v); 200 µL do produto da reacção foram lidos num leitor de microplacas Tecan Sunrise, a 595 nm.

III.4.3. Análise das proteínas por electroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)

Os extractos de proteínas foram analisados em géis de acrilamida a 8% e 12,5% (p/v), de acordo com o método de Laemmli UK ⁴¹. O gel de resolução continha acrilamida 8% ou 12,5% (p/v), bis-acrilamida 0,1% (p/v), Tris-HCl 0,4 M pH 8,8 e SDS 0,1% (p/v); os géis foram polimerizados com TEMED 0,005% (p/v) e o PSA 0,05% (p/v), preparados de fresco. O gel de concentração continha acrilamida 5% (p/v) e bis-acrilamida 0,14% (p/v), Tris-HCl 0,06 M pH 6,8 e SDS 0,1% (p/v) e foi polimerizado com TEMED 0,1% (p/v) e PSA 0,1% (p/v). Foram aplicados nos géis cerca de 16 a 20 µg e 14 a 16 µg de extractos proteicos citosólicos ou nucleares, respectivamente, na presença de tampão de amostra [SDS 1% (p/v), glicerol 5% (v/v), Tris 0,08 M pH 6,8 azul bromofenol 0,2% (p/v) e β-mercaptoetanol 5% (v/v)]. Antes da sua aplicação no gel as amostras ferveram durante 5 min. A electroforese decorreu com o tampão de electroforese [Tris base 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1% (p/v)], até a linha da frente atingir o final do gel.

III.4.4. Electrotransferência de proteínas

As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando um aparelho de transferência BIORAD, Trans-Blot SD. A transferência foi efectuada na presença do tampão de transferência constituído por Tris 48 mM. Glicina 39 mM, metanol 20% (v/v), SDS 0,0375% (p/v)⁴². A transferência durou 1 hora, a 0,8 mA/cm² de membrana, tendo o cuidado da tensão não exceder os 25 V. No final da transferência as proteínas da membrana foram coradas com a solução Ponceau S [Ponceau S a 0,2% (m/v). TCA 3% (m/v) e ácido sulfosalicílico 3% (m/v)].

III.4.5. Western Blot

Método A ⁴³:

Após hidratação a membrana é bloqueada com Tween-20 a 0,5% (p/v) dissolvido em ácido acético a 0,1% (v/v) durante 30 min com agitação constante. Posteriormente lavou-se a

membrana com água e com tampão de lavagem (150 mM NaCl, 10 mM Tris 0,05% Tween-20, pH 7,6). A membrana foi incubada com o anticorpo primário diluído em tampão de lavagem durante 2 h, seguindo-se a lavagem do excesso de anticorpo com tampão de lavagem 4 x 5 min. A incubação com o anticorpo secundário foi efectuada em tampão de lavagem durante 1 hora, seguindo-se a lavagem da membrana com tampão de lavagem 4 x 5 min e depois com água. A detecção da ligação proteína-anticorpo foi realizada recorrendo ao *kit* de revelação ECL, de acordo com as instruções do fabricante e as chapas autoradiográficas tratadas com as soluções de revelação e fixação apropriadas.

*Método B*⁴⁴:

Após hidratação a membrana é bloqueada com uma solução de incubação [leite magro desnatado 5% (m/v) em PBS] durante 1 hora, à temperatura ambiente, com agitação orbital. Posteriormente a membrana foi incubada com o anticorpo primário diluído em solução de incubação durante 2 h, seguindo-se a lavagem do excesso de anticorpo com a solução de PBS e Tween 20 0,1% (v/v) duas vezes durante 15 min e três vezes durante 5 min. A incubação com o anticorpo secundário foi efectuada em solução de incubação durante 1 hora, seguindo-se a lavagem da membrana com a solução PBS duas vezes durante 15 min e três vezes durante 5 min. Por fim, revelou-se a ligação do anticorpo por luminescência usando o *kit* ECL, tal como descrito atrás.

III.4.6. Tratamento de resultados das imagens obtidas por *Western blot*

As imagens das chapas obtidas por *Western blot* foram digitalizadas e tratadas utilizando o programa ImageJ.⁴⁵ Em cada ensaio experimental e para cada tempo de incubação fez-se a normalização em relação ao controlo do respectivo tempo de incubação das células com o agente em estudo, com vista a diminuir os possíveis erros associados às variações nos níveis das proteínas no extracto citosólico.

III.5 Análise estatística

Os resultados apresentados nos gráficos representam a média \pm desvio-padrão. Foi realizada uma análise estatística utilizando o teste t de *student* bilateral, tendo sido efectuada a comparação da média com 1: ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$.

IV. Resultados e discussão

Uma das bases do trabalho experimental desenvolvido foi a determinação das condições que definem o estado estacionário (s.s.).

IV.1. Calibração das condições de estabelecimento do estado estacionário

Para estabelecer o s.s. de H_2O_2 foi necessário determinar a constante de velocidade de consumo do mesmo pelas células intactas, de modo a adicionar a quantidade de glucose oxidase necessária para contrabalançar este consumo. Para tal, começou-se por determinar a actividade do enzima glucose oxidase.

IV.1.1. Actividade do glucose oxidase

O glucose oxidase utiliza dioxigénio e glucose para formar como produtos o H_2O_2 e a gluconolactona. A glucose necessária encontra-se presente no meio RPMI 1640.

A determinação da actividade do glucose oxidase não requer grande rigor, uma vez que para cada experiência de estado estacionário o volume a adicionar foi sempre ajustado com um ensaio teste. Assumindo uma reacção de primeira ordem, projectou-se a concentração de H_2O_2 em função do tempo, tendo-se obtido uma actividade específica de 0,229 $\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{l}$ (Fig 5).

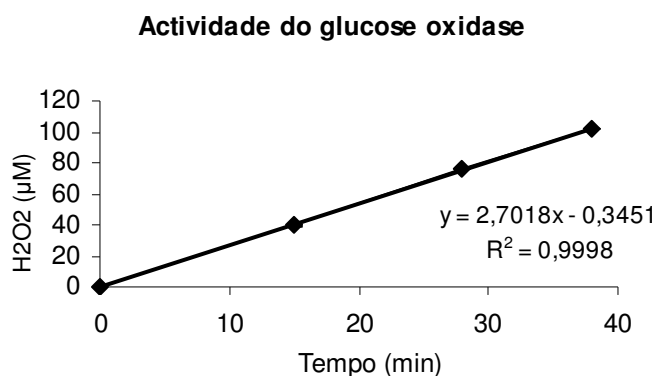


Figura 5 – **Produção de H_2O_2 pelo enzima glucose oxidase ao longo do tempo.** O volume reaccional inicial foi de 10 mL, retirando-se alíquotas de 1 mL ao longo do tempo para medir a produção no eléctrodo (método descontínuo). O declive da recta ajustada aos pontos experimentais foi de 2,7 μM $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$ (0,045 μM $\text{H}_2\text{O}_2/\text{s}$) ou 2,7 U/mL de volume reaccional.

IV.1.2. Consumo de peróxido de hidrogénio por células intactas

Como a constante de velocidade se mostrou variável nos vários ensaios de consumo de H_2O_2 por células intactas, utilizaram-se os valores obtidos nas últimas experiências de consumo realizadas (Quadro 1), já que foram efectuadas simultaneamente com ensaios de estado estacionário, para a linha celular HeLa.

	$\kappa \text{ (s}^{-1}/10^6 \text{ células} \times \text{mL)}$
Ensaio	0,012933
	0,010667
	0,011467
	0,012
Mediana \pm desvio-padrão	$0,011733 \pm 0,000953$

Quadro 1 – **Constantes de velocidade de consumo de H_2O_2 por células intactas HeLa.** Os valores dizem respeito a duas experiências de dias diferentes, cada uma em duplicado.

A constante de velocidade obtida, que corresponde ao declive da recta, foi de $0,00177 \text{ s}^{-1}$ (Quadro 1). Este valor encontra-se dependente da concentração de células presentes, e de modo a ser utilizado para o cálculo do estado estacionário normalizou-se com a concentração de células do ensaio: $0,00826 \text{ s}^{-1}/10^6 \times \text{mL}$.

Para a linha celular MCF-7, a constante de velocidade obtida foi de $0,0072 \text{ s}^{-1}$. Considerando a normalização com a concentração de células do ensaio chegou-se ao valor de $0,028 \text{ s}^{-1}/10^6 \times \text{mL}$.

IV.2. Determinação dos níveis de $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ e $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ por *Western blot*

Tal como definido nos objectivos do trabalho, pretendia-se estudar o papel específico que o H_2O_2 poderá ter na activação do NF- κB através das subunidades $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ e $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$. A activação do NF- κB foi induzida com doses de H_2O_2 em s.s. e/ou TNF- α , variando os tempos de exposição das células, e foi acompanhada através do estudo da variação dos níveis de $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ e $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ no citosol. Os níveis destas subunidades foram determinados nas fracções proteicas citosólicas por *Western blot*, em cada uma das situações de tratamento, usando anticorpos específicos.

IV.2.1. Optimização das condições do *Western blot*; titulação dos anticorpos

Para a detecção das proteínas $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ e $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ por *Western blot*, o fornecedor dos anticorpos recomendava uma diluição de 1:200 para cada um deles. Com o objectivo de determinar a melhor diluição dos anticorpos a utilizar nas nossas condições experimentais, foi feita uma titulação para cada um dos anticorpos, com as diluições de 1:400, 1:800 e 1:1000. Para estas experiências preliminares foram usadas duas concentrações de acrilamida diferentes, para se definir as condições de melhor separação. Na Fig.6 podemos observar os resultados obtidos, por *Western blot*, após separação do extracto citosólico num gel de 10% (p/v) de acrilamida e incubado com diferentes diluições do anticorpo anti- $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ (Fig.6-A) e após separação num gel de 8% (p/v) de acrilamida e incubado com diferentes diluições do

anticorpo anti-I κ B ϵ (Fig.6-B). As condições de incubação dos anticorpos foram feitas de acordo com o método A (descrito em III.4.5.)

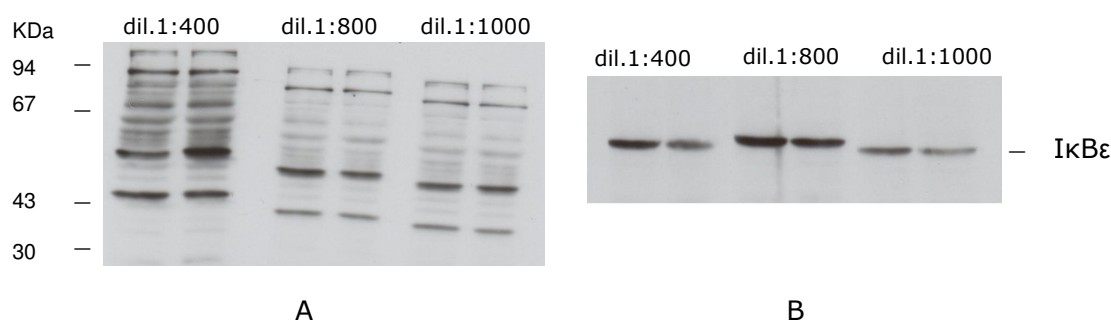


Figura 6 – **Titulação dos anticorpos anti- I κ B β (A) e anti- I κ B ϵ (B).** 16 μ g das proteínas do citosol de células HeLa foram separadas num gel 10% (p/v) de acrilamida (A) ou num gel 8% (p/v) de acrilamida (B), transferidas e incubadas com o anti-I κ B β (A) e com o anti-I κ B ϵ (B) nas diluições dos anticorpos indicadas, de acordo com o método A (descrito em III.4.5).

A reacção com o anticorpo anti-I κ B ϵ apresentou apenas uma banda, com a massa molecular esperada (51 kDa), tratando-se assim de um anticorpo específico para a detecção da proteína I κ B ϵ . A análise dos extractos proteicos no gel de 8% de acrilamida revelou-se adequado para a identificação da banda relativa ao I κ B ϵ , tendo-se optado por escolher a diluição do anticorpo de 1:800 a utilizar nas experiências futuras. No que se refere ao anticorpo anti-I κ B β , tal como se pode ver na figura 6-A, nas condições de *Western blot* utilizadas, o anticorpo liga-se de um modo inespecífico a uma série de proteínas, revelando-se impossível identificar a banda correspondente ao I κ B β , com massa molecular de 45 kDa. Com o objectivo de tentar resolver este problema, foram alteradas algumas condições experimentais, tais como a percentagem de acrilamida no gel, passando a utilizar-se um gel com 12.5% (m/v) de acrilamida, e o procedimento de *Western blot* (Método B - descrito em III.4.5). Na Fig.7 podemos observar os resultados do *Western blot* obtidos nessas condições.

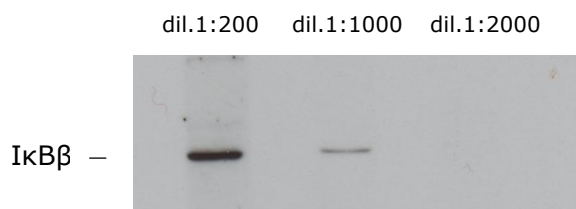


Figura 7 – **Titulação do anticorpo anti- I κ B β .** 20 μ g das proteínas do citosol de células HeLa foram separadas num gel 12,5% (p/v) de acrilamida, transferidas e incubadas com o anti-I κ B β nas diluições dos anticorpos indicadas, de acordo com o método B (descrito em III.4.5)..

O procedimento do *Western blot* segundo o método B veio alterar completamente os resultados anteriores, passando-se a obter apenas uma banda após ligação com o anticorpo

anti-I κ B β , com a massa molecular esperada (45 kDa). A partir dos resultados obtidos na figura 7 decidiu-se utilizar uma diluição de 1:400 para o anticorpo anti-I κ B β , nas nossas condições experimentais.

IV.2.2. Estudo da degradação do I κ B β e I κ B ϵ nas células HeLa tratadas com 10 ng/ml TNF- α

Os estudos que têm sido feitos com as isoformas de inibidores proteicos I κ B têm utilizado como indutor preferencial o TNF- α . Dado que os poucos resultados que existem na literatura são contraditórios e dependem do tipo de células e da concentração do TNF- α , era necessário observar o comportamento de degradação destas subunidades em células HeLa tratadas 10 ng/ml de TNF- α , que é a concentração utilizada na maioria dos estudos existentes na literatura^{31,46,47}, mais especificamente para a subunidade I κ B α . Os dados da literatura também indicam que as subunidades I κ B β ¹⁵ e I κ B ϵ ^{22,23} têm um cinética de degradação mais lenta que a subunidade I κ B α , pelo que iniciaram-se as experiências com as células HeLa tratadas com o TNF- α durante tempos curtos (15, 30, 45 e 60 min) e tempos longos (90 e 120 min). Os resultados obtidos encontram-se na Fig.8.

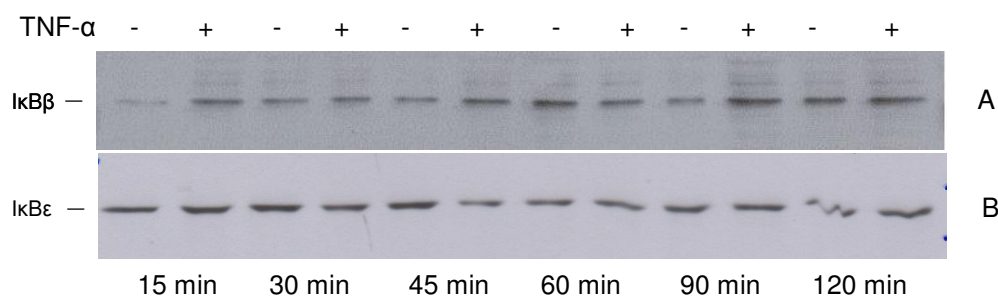


Figura 8 – Géis representativos da cinética de degradação do I κ B β (A) e do I κ B ϵ (B) obtida em células HeLa tratadas com 10 ng/mL de TNF- α . 12 μ g (I κ B β) e 5 μ g (I κ B ϵ) das proteínas do citosol de células HeLa, tratadas com 10 ng/ml de TNF- α durante vários tempos (15, 30, 45, 60, 90 e 120 min), foram separadas num gel de acrilamida, transferidas e incubadas com o anti-I κ B β (A) e com o anti-I κ B ϵ (B).

Após quantificação dos resultados observou-se que os valores de indução ou degradação não eram significativos, para cada um dos tempos, sendo a quantidade das subunidades existente no citosol aproximadamente igual à dos controlos. Assim optou-se por recorrer a uma concentração mais baixa de TNF- α – 0,37 ng/mL – que foi o valor previamente utilizado no laboratório para os estudos de degradação do I κ B α na indução do NF- κ B.

IV.3. Estudo da degradação do I κ B β e I κ B ϵ nas células HeLa e MCF-7 tratadas com 0,37 ng/ml TNF- α

Actualmente parece claro que as três isoformas dos I κ Bs combinam as suas funções de modo a permitir que o módulo de sinalização seja diferenciado entre estímulos curtos e persistentes³¹; nisto reside a chave para respostas diferentes em vias de degradação semelhantes e/ou estímulos diferentes.

De acordo com o modelo de activação do NF- κ B, cuja descrição se encontra bem fundamentada para o I κ B α , após o tratamento das células HeLa e MCF-7 com 0,37 ng/ml de TNF- α ocorre uma rápida e quase completa degradação desta proteína inibitória, com máximos de degradação aos 30 e 60 min de exposição, em ambas as linhas celulares (ver Anexo I).

Na Fig.9 encontram-se os resultados, sob a forma de gráfico, do efeito da concentração de 0,37 ng/ml de TNF- α nas subunidades inibidoras I κ B β e I κ B ϵ nas células HeLa e MCF-7.

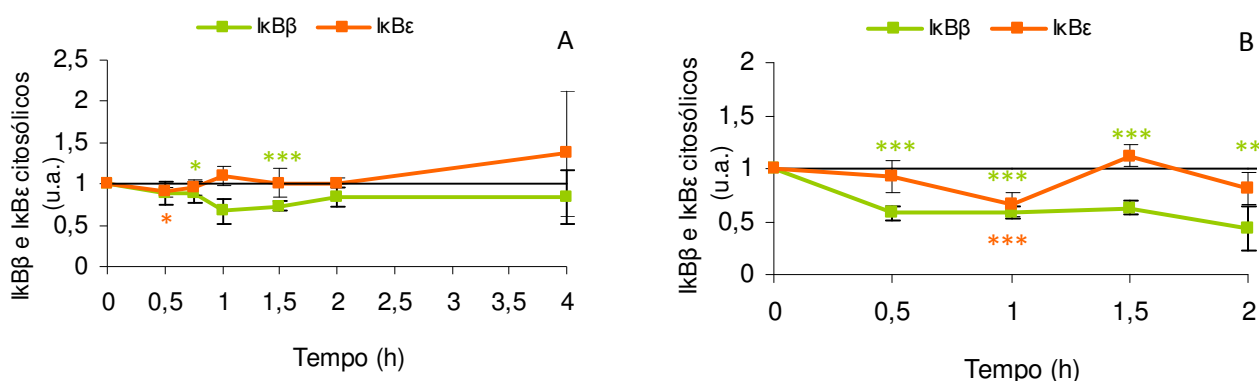


Figura 9 – **Variação dos níveis de I κ B β e de I κ B ϵ no citosol ao longo do tempo causada por exposição das células HeLa (A) e MCF-7 (B) ao TNF- α 0,37 ng/ml.** Análise quantitativa das bandas respeitantes ao I κ B β e ao I κ B ϵ nas amostras citosólicas obtidas por *Western blot*, em células HeLa (à esquerda) e MCF-7 (à direita), ao longo do tempo. Os níveis proteicos das amostras são expressos em unidades arbitrárias (u.a.) relativamente aos controlos. Os resultados estatisticamente diferentes do controlo são assinalados com ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05 para I κ B β assinalado na parte superior e para I κ B ϵ na parte inferior. Os dados representam uma amostra com *n* variável entre 8 e 10.

Pode observar-se na Fig.9-A que 0,37 ng/ml de TNF- α induzem a degradação do I κ B β em células HeLa, ao contrário do que foi apresentado por Thompson *et al* (1995)¹³, em estudos feitos com células Jurkat e 1 ng/ml de TNF- α . A degradação inicia-se lentamente atingindo um pico máximo aos 60 min. Após esse pico, os níveis proteicos aproximam-se gradualmente do valor inicial e permanecem abaixo desse valor até às 4 h. É curioso notar que Oliveira-Marques *et al* (ver Anexo I) observaram, nestas condições experimentais, que o valor máximo de indução de p65, medida pela quantificação desta proteína no núcleo por *Western blot*, coincide com o pico máximo de degradação da subunidade I κ B β induzida pelo

TNF- α . Por outro lado, enquanto ocorre translocação de p65 para o núcleo (desde a 1h às 4 h)³⁷, o I κ B β mantém-se com um nível de degradação de aproximadamente 30%. A contínua translocação de p65 para o núcleo durante este tempo pode ser explicada pela manutenção da subunidade I κ B β degradada neste mesmo intervalo de tempo.

No caso do tratamento em MCF-7, como se pode ver a partir da Fig.9-B, os resultados obtidos para a subunidade I κ B β são semelhantes aos obtidos para as células HeLa; a subunidade sofre uma degradação gradual até aos 30 min, mantendo-se até às 2 h. É de notar que os níveis máximos de degradação desta subunidade não são tão baixos, quando comparados com os níveis de degradação do I κ B α (ver Anexo I). Uma outra diferença do comportamento destas duas subunidades é que os níveis da subunidade I κ B α são recuperados quase aos valores iniciais ao fim de 2 h, o que não acontece com a subunidade I κ B β . Tal como nas células HeLa, também nestas células os níveis altos de p65 no núcleo³⁷ podem ser mantidos pela manutenção da subunidade I κ B β degradada. Alguns estudos mencionam o aparecimento de duas bandas nos *immunoblots* do I κ B β , o que também sucedeu nalguns ensaios em células HeLa. As razões para este facto podem atribuir-se, por um lado, a uma forma fosforilada que é alvo de degradação, pois desaparece em determinados casos após indução¹³, ou por outro lado, pode atribuir-se essa banda adicional, detectada de forma inconsistente, a um produto de degradação, ou resultado de reactividade cruzada do anticorpo policlonal⁴⁸.

Destes resultados retêm-se informações importantes, que permitem distinguir o I κ B α do I κ B β : 1) o efeito do TNF- α é semelhante no I κ B α e no I κ B β , embora de uma forma menos acentuada; e 2) a recuperação do I κ B α na fracção citosólica ocorre de uma forma rápida, enquanto a degradação do I κ B β se mantém. Esta manutenção dos níveis baixos de I κ B β contribui para a activação persistente do NF- κ B via degradação I κ Bs. Pressupõe-se, então, que, ou os dois I κ B tenham vias de sinalização distintas, ou, assumindo que são afectados no mesmo momento, os complexos I κ B β persistem no núcleo durante um maior período de tempo¹³, o que poderia explicar a manutenção da fracção citosólica abaixo do valor dos controlos.

Relativamente à subunidade I κ B ϵ , nas nossas condições experimentais observou-se em células HeLa uma degradação muito ligeira do I κ B ϵ induzida pelo TNF- α aos 30 min, aproximando-se do valor inicial aos 60 min e mantendo-se assim até às 4 h (Fig.9-A). No caso das células MCF-7 (Fig.9-B) observa-se um comportamento oscilatório, com o máximo de degradação da subunidade I κ B ϵ à 1 h. O padrão de degradação por indução do TNF- α do I κ B ϵ foi descrito em células endoteliais²⁴ e é distinto do conhecido para o I κ B α e I κ B β : após 15 min em contacto com o indutor, a proteína é degradada e reaparece após 6 h de

indução. Relativamente a esta subunidade têm sido obtidos resultados bastante variáveis: em células Ramos (linfoma de Burkitt) o TNF- α não afecta o nível dessa proteína³³; no entanto, em células THP-1 monocíticas humanas, o nível de I κ B ϵ decresce apenas 10 min após indução, havendo uma acumulação da subunidade mais tarde⁴⁹, tal como parece ter sido o caso dos resultados obtidos neste estudo. Todos estes resultados sugerem que a especificidade celular pode afectar seriamente a resposta do factor de transcrição em estudo. Se tivermos em conta que, dentro da mesma linha celular, existem múltiplos complexos funcionais NF- κ B distintos que se podem associar com os diferentes I κ Bs, podemos explicar os resultados obtidos e prever respostas diferenciadas a uma série de diferentes estímulos externos. Em termos globais pode dizer-se que, quando ocorre, o nível de degradação do I κ B ϵ é menor do que o observado para os outros I κ Bs, sugerindo que esta proteína tem um papel distinto no controlo da activação do NF- κ B²⁵.

Comparando os resultados obtidos para o I κ B ϵ com os níveis de p65³⁷ exibidos nas linhas celulares por indução com o TNF- α em condições experimentais idênticas às utilizadas neste trabalho, pode concluir-se que esta subunidade parece não interferir com a activação de p65. Tal como foi referenciado na introdução, a subunidade I κ B ϵ parece estar preferencialmente complexada com homo e heterodímeros de c-Rel e p65¹⁴, pelo que a via de activação destes complexos pode ser uma via diferente da activação do complexo quando está inibido pelas subunidades I κ B α e I κ B β . No caso da subunidade I κ B β existe coincidência entre o pico máximo de p65 translocada e o pico de degradação dessa proteína, o que nos dá informação de que os dímeros citoplasmáticos estão distribuídos pelas diferentes isoformas de I κ Bs, nomeadamente I κ B α e I κ B β .

IV.4. Estudo da degradação do I κ B β e I κ B ϵ nas células HeLa e MCF-7 tratadas com 25 μ M de H₂O₂ em estado estacionário

O modelo de activação do NF- κ B pelo *stress* oxidativo tem sido revisto sistematicamente, em virtude de contínuas descobertas acerca do papel de diversas espécies reactivas de oxigénio, incluindo o H₂O₂, nesse processo. Para além de se poder afirmar que a activação do NF- κ B pelo H₂O₂ depende do tipo celular em causa, também é evidente que, caso essa activação ocorra, ela é distinta da protagonizada por outros indutores, como a IL-1 ou o TNF- α . De uma forma geral, pode dizer-se que as diversas vias fisiológicas do NF- κ B dependem do estado celular redox da célula. No decorrer deste trabalho utilizou-se o H₂O₂ para estudar a activação do NF- κ B, mas utilizando um modo de adição do H₂O₂ diferente do habitual; neste caso o H₂O₂ é adicionado em estado estacionário, tal como foi referenciado na introdução, permitindo a utilização de concentrações mais baixas de H₂O₂ assim como controlar a concentração de H₂O₂ durante o tratamento.

Na Fig.10 apresentam-se os gráficos resultantes da quantificação dos resultados obtidos por *Western blot*, com os anti-IkB α e anti-IkB β , após análise dos extractos proteicos das células HeLa e MCF-7 tratadas com 25 μ M de H₂O₂ ss. É possível observar que nas duas linhas celulares não se verificam decréscimos ou aumentos acentuados em nenhuma das duas moléculas inibitórias em estudo. Comparando com os resultados obtidos após tratamento com o TNF- α poder-se-á dizer que o mecanismo de indução do NF- κ B pelo H₂O₂ deve seguir uma via distinta da do outro indutor.

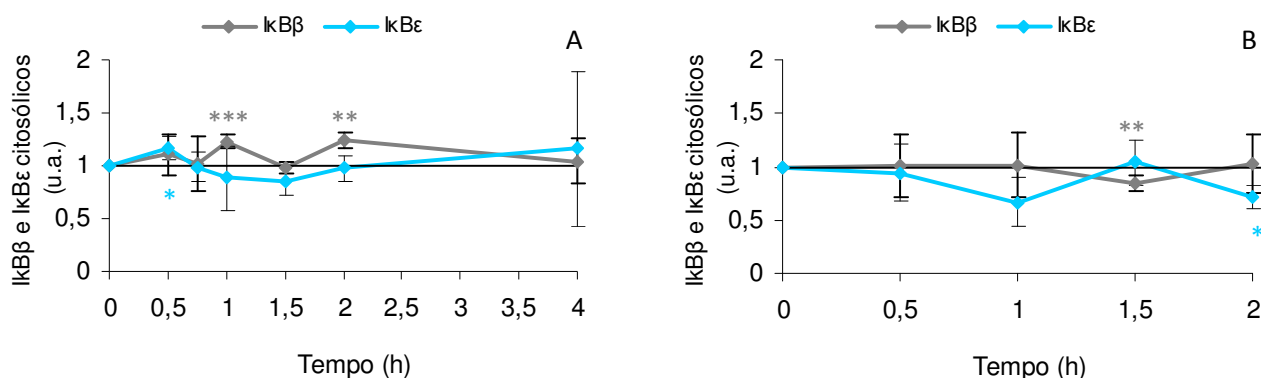


Figura 10 – **Variação dos níveis de IkB β e de IkB ϵ no citosol ao longo do tempo causada por exposição das células HeLa e MCF-7 ao H₂O₂ em s.s. de 25 μ M.** Análise quantitativa das bandas respeitantes ao IkB β e ao IkB ϵ nas amostras citosólicas obtidas por *Western blot*, em células HeLa (A) e MCF-7 (B), ao longo do tempo. Os níveis proteicos das amostras são expressos em unidades arbitrárias (u.a.) relativamente aos controlos. Os resultados estatisticamente diferentes do controlo são assinalados com ***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05 para IkB β assinalado na parte superior e para IkB ϵ na parte inferior. Os dados representam uma amostra com *n* variável entre 8 e 10.

Analisando mais detalhadamente os gráficos da Fig.10-A, observa-se que para as células HeLa, o H₂O₂ estimula o IkB ϵ aos 30 min e o IkB β aos 60 e 120 min. A resposta mais rápida do IkB ϵ deve-se a uma relocalização deste IkB no citosol^{50,51}. O H₂O₂ não afecta a degradação das duas moléculas inibitórias a tempos longos (4 h), tal como foi observado para o IkB α (ver Anexo I), e que está de acordo com a não translocação da p65 para o núcleo, ao longo do tempo do ensaio.

No caso das células MCF-7 (Fig.10-B), o IkB β não sofre alterações significativas mediante a acção deste oxidante, estando os níveis proteicos próximos dos valores dos controlos. O IkB ϵ , por seu lado, demonstra algumas oscilações em torno da unidade, sem alterações significativas. No entanto, às 2 h de tratamento observa-se uma ligeira degradação desta subunidade. Nesta linha celular, Virgínia *et al*⁶⁷ observaram que às 2 h de ensaio se inicia um ligeiro aumento dos valores da p65, e para esse mesmo tempo de ensaio, também se

observa uma degradação da subunidade I κ B α causada pelo H₂O₂, tal como a observada para a subunidade I κ B ϵ .

IV.5. Estudo da degradação do I κ B β e I κ B ϵ nas células HeLa e MCF-7 tratadas com 0,37 ng/ml TNF- α e com 25 μ M de H₂O₂ em estado estacionário

Como já tinha sido reportado anteriormente³⁷, o H₂O₂ por si só parece não desempenhar um papel na activação do NF- κ B, pelo que poderia ser-lhe atribuído um papel de modulador, positivo ou negativo, na activação deste factor de transcrição induzida pelo TNF- α . Na Fig.11 apresentam-se os resultados obtidos para o comportamento das subunidades I κ B β e I κ B ϵ em células HeLa e MCF-7, tratadas com TNF- α 0,37 ng/ml e [H₂O₂]ss 25 μ M, ao longo do tempo.

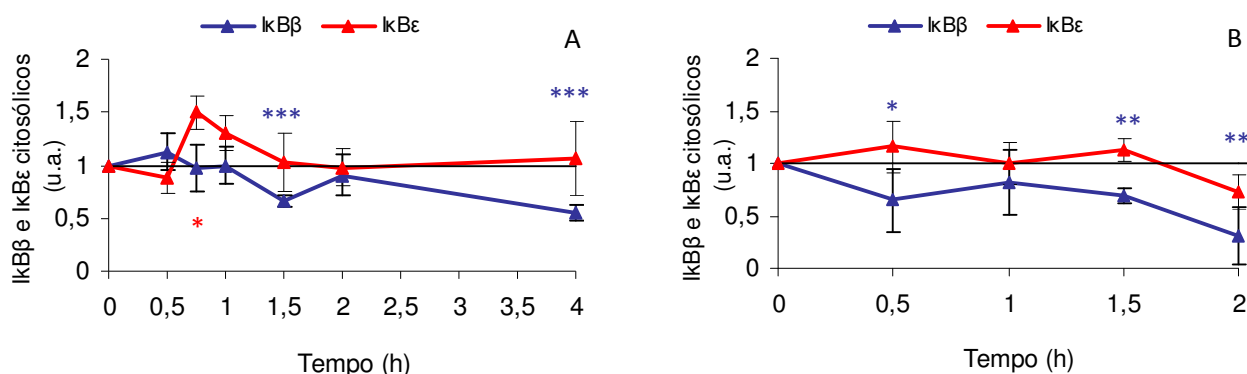


Figura 11 – **Variação dos níveis de I κ B β e de I κ B ϵ no citosol ao longo do tempo causada por exposição das células HeLa e MCF-7 aos dois agentes simultaneamente (TNF- α 0,37 ng/mL e H₂O₂ em s.s. de 25 μ M).** Análise quantitativa das bandas respeitantes ao I κ B β e ao I κ B ϵ nas amostras citosólicas obtidas por *Western blot*, em células HeLa (A) e MCF-7 (B), ao longo do tempo. Os níveis proteicos das amostras são expressos em unidades arbitrárias (u.a.) relativamente aos controlos. Os resultados estatisticamente diferentes do controlo são assinalados com ***, p<0.001; **, p<0.01; *, p<0.05 para I κ B β assinalado na parte superior e para I κ B ϵ na parte inferior. Os dados representam uma amostra com *n* variável entre 8 e 10.

Analisando os resultados obtidos para a linha celular HeLa, observa-se que embora aos 30 minutos ocorra uma ligeira indução do I κ B β (Fig.11-A), os níveis desta subunidade voltam aos valores dos apresentados nas células controlo ao fim dos 45 e 60 minutos. Ao fim de 1,5h observa-se uma degradação da subunidade, mantendo-se esta situação até às 4h. Relativamente ao I κ B ϵ é evidente uma indução aos 45 min, que diminui gradualmente até 1,5 h, mantendo-se próxima de 1 até às 4 h.

Em células MCF-7 (Fig.11-B), o I κ B β inicia uma degradação logo aos 30 min de ensaio, que se mantém ao longo do tempo, com uma maior degradação às 2 h de exposição aos indutores. Para o I κ B ϵ é interessante observar que a cinética não sofre grandes alterações

até às 2 h de exposição, altura em que ocorre uma degradação, embora menos pronunciada do que no caso do I κ B β .

No caso em que ocorre degradação das subunidades, ela não é comparável ao elevado grau de degradação sofrido pelo I κ B α ³⁷. Molecularmente, o I κ B β partilha maiores semelhanças com essa molécula inibitória¹⁸ pelo que isso poderá explicar a cinética de degradação mais idêntica à subunidade I κ B α . Considerando os valores de p65 translocados para o núcleo³⁷ é interessante verificar que nesta linha celular o pico máximo de indução dessa proteína é coincidente com o máximo de degradação das duas proteínas inibitórias.

No sentido de melhor compreender o papel modulador exercido pelo H₂O₂ na activação do NF- κ B pelo TNF- α , reuniram-se os resultados obtidos para cada subunidade e para cada linha celular num só gráfico, após tratamento com os indutores individualmente ou em conjunto, tal como indicado na Fig.12.

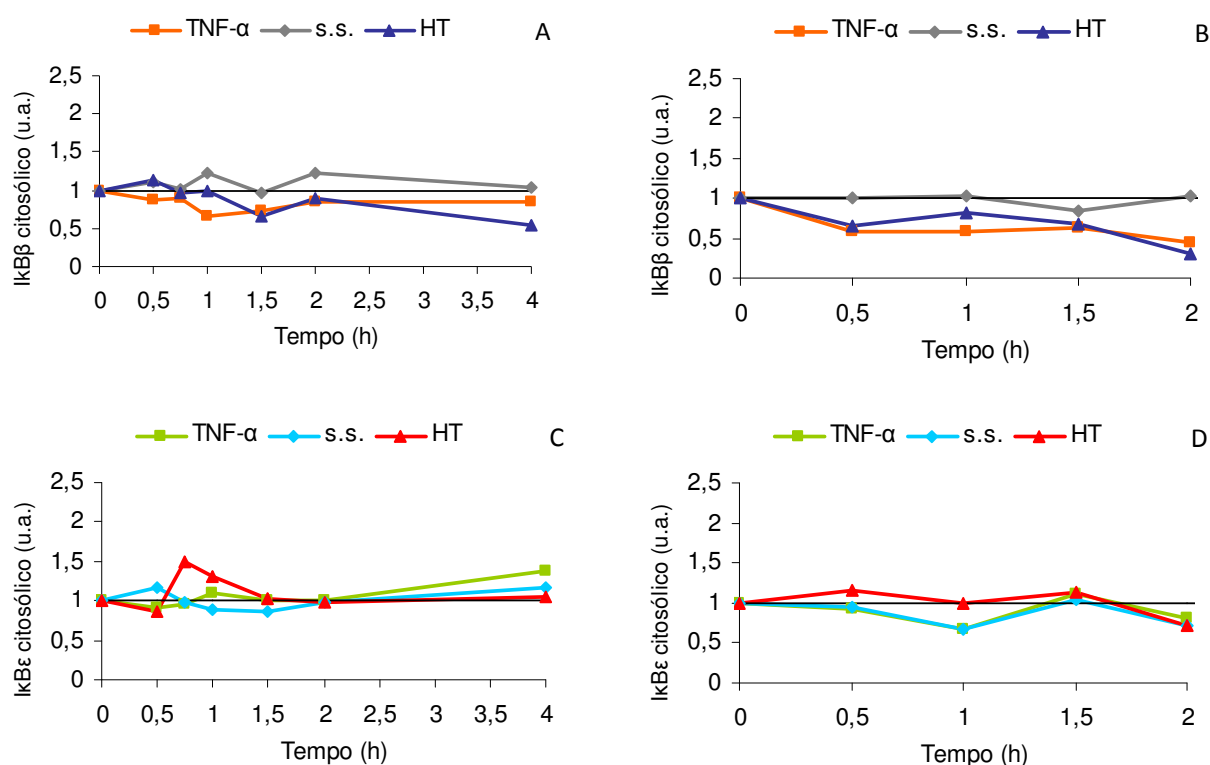


Figura 12 – **Variação dos níveis de I κ B β e de I κ B ϵ no citosol ao longo do tempo causada por exposição das células HeLa e MCF-7 ao TNF- α 0,37 ng/mL (■), ao [H₂O₂]_{s.s.} 25 μ M (◆) e aos dois agentes simultaneamente (▲). Análise quantitativa das bandas respeitantes ao I κ B β (A e B) e ao I κ B ϵ (C e D) nas amostras citosólicas obtidas por *Western blot*, em células HeLa (A e C) e MCF-7 (B e D), ao longo do tempo.**

Até à 1 hora de incubação, o TNF- α induz ligeiramente a degradação da subunidade β em HeLa (Fig 12-A) , ao contrário do que acontece quando as células são tratadas com o H₂O₂ ou com os dois indutores em conjunto, em que deixa de haver degradação da subunidade. Neste caso o H₂O₂ está a contrariar a acção do TNF- α , modulando negativamente o seu

papel. No entanto, ao tempo longo de tratamento, 4 h, passa a haver modelação positiva do H_2O_2 no tratamento com TNF- α , havendo uma maior degradação da subunidade I κ B β .

No caso das células MCF-7 a acção conjunta dos indutores (TNF- α e H_2O_2) induz a degradação da subunidade I κ B β (Fig.12-B) na mesma ordem de grandeza do que foi observado nas células induzidas pelo TNF- α . Este comportamento leva-nos a dizer que o papel do H_2O_2 não é, neste caso, relevante pois não modula a acção do TNF- α . Este facto é diferente do que foi observado para a subunidade I κ B α (ver Anexo I), para a qual o H_2O_2 aumenta a sua degradação na presença de TNF- α . No caso da subunidade I κ B ϵ podemos observar que a resposta desta subunidade aos dois agentes é modulada pelo H_2O_2 : nas células HeLa (Fig. 12-C) há uma forte indução da subunidade com um pico aos 45 min, enquanto no caso das células MCF-7 (Fig.12-D) há uma diminuição da degradação da subunidade aos 30 e 60 minutos. Estes resultados acentuam a ideia de que o H_2O_2 tem uma contribuição secundária na activação do NF- κ B, podendo actuar como modulador da acção do TNF- α . Por outro lado também confirmam a ideia de que esta modulação é dependente do tipo de células. Esta cinética de indução parece concordar com a literatura^{31,32} no sentido em que estes autores apresentam a actividade do NF- κ B dependente do papel do I κ B ϵ e/ou do I κ B β nas oscilações sustentadas do I κ B α , o que afecta, por conseguinte, a expressão selectiva de genes.

IV.6. Determinação dos níveis de c-Rel nas células tratadas com H_2O_2 , TNF- α e com H_2O_2 + TNF- α por *Western blot*

Como já foi referido atrás o I κ B ϵ associa-se a homodímeros e heterodímeros de c-Rel e p65¹⁴. Tendo-se averiguado que esta proteína exibe uma cinética distinta da do I κ B β e do I κ B α , foram analisados por *Western blot* os níveis nucleares de c-Rel em células tratadas com TNF- α , H_2O_2 e ambos os indutores, nas duas linhas celulares; os resultados obtidos por *Western blot* foram quantificados e apresentados na Fig.13.

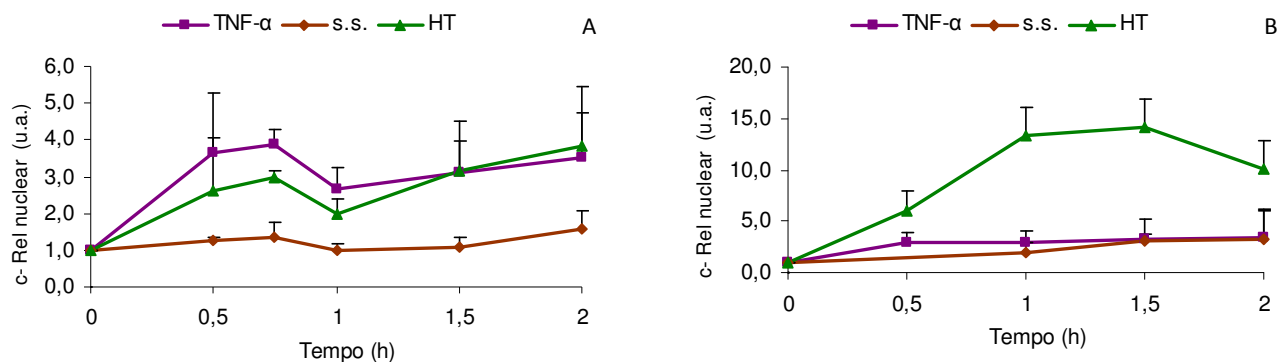


Figura 13 – Variação dos níveis de c-Rel no núcleo ao longo do tempo causada por exposição das células HeLa e MCF-7 ao TNF- α 0,37 ng/mL (■), ao [H₂O₂]_{s.s.} 25 μ M (♦) e aos dois agentes simultaneamente (HT) (▲). Análise quantitativa das bandas respeitantes ao c-Rel nas amostras nucleares obtidas por *Western blot*, em células HeLa (A) e MCF-7 (B), ao longo do tempo. Diluição do anticorpo anti-c-Rel de 1:300. Os dados representam uma amostra com *n* variável entre 3 e 5.

Até 1h após exposição das células HeLa aos agentes indutores TNF- α e HT os níveis proteicos nucleares de c-Rel sofrem um perfil de indução idêntico, embora com menor amplitude para o caso do HT, atingindo-se um ponto máximo de proteína aos 45 min de exposição. Quando as células são tratadas simultaneamente com H₂O₂ e TNF- α , nota-se uma modulação negativa do H₂O₂ sobre a indução da c-Rel. A partir desse ponto do ensaio, os níveis da proteína c-Rel aumentam novamente com um máximo às 2 h de exposição, não havendo já modulação da acção do TNF- α por parte do H₂O₂. A indução com H₂O₂ não afecta significativamente os níveis desta proteína. É interessante observar a coincidência de máximos obtidos nos 45 minutos de ensaio entre o nível de indução do I κ B ϵ (Fig.11-A) e o nível máximo de indução de c-Rel com TNF- α e os dois agentes em simultâneo. O aumento do I κ B ϵ está relacionado com a inibição da translocação de c-Rel. É pois provável que, na presença dos dois agentes indutores, haja uma via de activação do c-Rel diferente da habitual e/ou uma acumulação da subunidade I κ B ϵ no citoplasma, que nestas condições fica impedida de ser degradada.

No caso das células MCF-7, tal como se pode ver na Fig.13-B, há uma ligeira indução de translocação do c-Rel para o núcleo quando as células são tratadas com TNF- α ou com H₂O₂. No entanto, quando as células são tratadas com os dois agentes em simultâneo observa-se uma forte indução do c-Rel, com o máximo entre a 1 h e a 1,5 h. É curioso referir que, neste caso, o H₂O₂ tem um efeito modulador positivo sobre a acção do TNF- α .

V. Conclusões

Com o trabalho desenvolvido nesta tese, pretende-se contribuir para o conhecimento de um papel fisiológico ao H₂O₂ na activação do NF- κ B, propondo possíveis funções das espécies reactivas de oxigénio como intermediários em mecanismos de transdução de sinal.

Partindo do trabalho de Oliveira Marques³⁷ que observou que a activação do NF- κ B pelo $[H_2O_2]_{ss}$ não está associada a um decréscimo dos níveis do I κ B α , tornou-se importante averiguar o efeito do H_2O_2 nas outras subunidades inibitórias – I κ B β e I κ B ϵ -, a relação das diferentes subunidades inibitórias na activação do NF κ B e qual a importância relativa de cada uma delas sob acção do H_2O_2 .

Os I κ Bs respondem de forma diferente aos sinais indutores de activação deste factor de transcrição, resposta essa que está dependente do tipo celular e do estímulo. De uma forma geral, o I κ B α é rapidamente degradado, enquanto o I κ B β e o I κ B ϵ têm uma cinética de degradação mais lenta^{11,52,53}. Embora as cascatas de transdução de sinal a montante da translocação do NF κ B possam variar com o estímulo, é provável que convirjam no ponto de activação dos IKK ou perto desse ponto⁴⁶. Os IKK são complexos de proteínas que catalisam a fosforilação dos resíduos de serina dos I κ Bs na porção N-terminal. Essa fosforilação conduz ao reconhecimento dos fosfo-I κ Bs pelo complexo ubiquitina-ligase, que por sua vez dita a poliubiquitinação dos I κ Bs e posterior degradação pelo proteossoma 26S. A fosforilação e poliubiquitinação dos I κ Bs não são, contudo, suficientes para dissociar os I κ Bs do NF- κ B libertando o factor de transcrição para ser translocado para o núcleo. Jaspers *et al* em 2001⁴⁶ observaram, em células epiteliais das vias respiratórias, que o tratamento com H_2O_2 aumenta a actividade dos IKK, a fosforilação e ubiquitinação do I κ B α mas não é responsável pela ruptura do I κ B α e pela translocação nuclear do NF- κ B. Estes investigadores também observaram que a presença do H_2O_2 inibiu a ruptura do I κ B α induzida pelo TNF- α , a ligação do NF- κ B ao DNA e a transcrição dependente do NF- κ B. Em suma, estas conclusões reflectem que a cascata de activação do NF- κ B está a ser afectada a dois níveis: 1) na activação dos IKK e 2) na inibição da degradação proteolítica do I κ B α fosforilado e ubiquitinado. Isto pode ser interpretado como um possível efeito protector do H_2O_2 na via de activação do NF- κ B⁴⁶.

Os resultados da activação do NF- κ B utilizando o TNF- α como indutor mostraram que o I κ B β é degradado com uma cinética menos pronunciada do que o I κ B α . Esta observação está de acordo com os estudos efectuados por Chen *et al*⁵⁴ que também verificaram que em células HeLa, o TNF- α induz cinéticas de degradação diferentes nos dois I κ B e atribui essa diferença à existência de dois tipos de *pool* em células quiescentes: um complexo binário e outro complexo ternário associando o NF- κ B e o κ B-Ras, este último mais resistente à degradação induzida por um estímulo. Também foi confirmado neste trabalho que o H_2O_2 não está envolvido nesta via de degradação do I κ B β . Note-se que para o I κ B ϵ , e apenas na linha celular HeLa, ocorre um aumento acima do valor dos controlos após 30 minutos de indução com H_2O_2 . Se tivermos em conta que na subunidade α ocorre um comportamento

semelhante, podemos atribuir estes dados a uma realocização dos I κ B no citosol, tal como foi previsto por alguns investigadores^{50,51}. A cinética de indução sofrida por esta proteína sob acção do TNF- α está relacionada com o seu papel nas oscilações sustentadas do I κ B α ³², embora interesse salientar, mais uma vez, que esta subunidade tem respostas que estão dependentes do tipo celular e do estímulo³³.

Os valores de degradação evidenciados no I κ B β nas duas linhas celulares são justificados tendo como base o cálculo da concentração citosólica do H₂O₂. Anteriormente obtido para MCF-7 um gradiente igual a 2³⁷ e obtido posteriormente para HeLa um gradiente igual a 7 (dados não mostrados), estes valores indicam que as células HeLa são menos permeáveis ao H₂O₂ do que as MCF-7, explicando, possivelmente, os resultados obtidos. O valor máximo de p65 é coincidente com o valor máximo de degradação do I κ B α , pelo que se atribui uma responsabilidade a este I κ B pela localização daquela proteína no núcleo, enquanto que o I κ B β poderá ser responsável pela degradação sustentada do p65. Tendo em conta que os valores de c-Rel também aumentaram após estímulo com TNF- α , então comprova-se que o I κ B β também pode ser responsável pelo aumento do c-Rel no núcleo.

A modulação da expressão génica induzida pelo TNF- α em co-estimulação pelo H₂O₂ pode ser fisiologicamente relevante. Durante a inflamação aguda, as células epiteliais estão potencialmente expostas em simultâneo a situações de *stress* oxidativo e ao TNF- α , devido à libertação de TNF- α e espécies reactivas de oxigénio pelos fagócitos infiltrados, ao mesmo tempo que são libertadas mais quimiocinas que recrutam outros fagócitos^{10,54}. Deste modo, o H₂O₂ poderá ter um papel de atenuação da expressão de genes dependentes de NF- κ B, diminuindo a resposta pró-inflamatória que, de outra forma, poderia tornar-se prejudicial.

Nas duas linhas celulares ocorre degradação do I κ B α por acção dos dois indutores e também se verificou acréscimo nos valores de p65 e c-Rel, comprovando assim a ligação desta proteína inibitória com dímeros de p65 e c-Rel. No caso do I κ B β , nas células MCF-7, o comportamento aquando da indução com TNF- α é semelhante ao induzido pelo H₂O₂ e TNF- α , o que exclui o H₂O₂ como modulador da degradação do I κ B β . Nas células HeLa, a discussão é semelhante.

Finalmente podemos concluir que no comportamento do I κ B ϵ e do c-Rel em resposta ao tratamento conjunto do H₂O₂ e do TNF- α , há um importante sinergismo entre estes dois indutores nas células MCF-7 e um antagonismo nas células HeLa, a tempos curtos de incubação. Por outro lado, os resultados obtidos confirmam que existem diferentes proporções dos complexos NF- κ B/I κ B nos diferentes tipos de células, indicando que o dímero c-Rel também se encontra ligado ao I κ B α maioritariamente nas células MCF-7, mas provavelmente ao I κ B ϵ nas células HeLa.

VI. Bibliografia

1. Flohe, L., Brigelius-Flohe, R., Saliou, C., Traber, M.G. & Packer, L. Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radic. Biol. Med.* **22**, 1115-1126 (1997).
2. Bharti, A.C. & Aggarwal, B.B. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem. Pharmacol.* **64**, 883-888 (2002).
3. NF-kB. 2008.
4. Chen, L.F. & Greene, W.C. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 392-401 (2004).
5. Janssen-Heininger, Y.M., Poynter, M.E. & Baeuerle, P.A. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 1317-1327 (2000).
6. Hayden, M.S. & Ghosh, S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* **18**, 2195-2224 (2004).
7. Yu, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* **74**, 139-162 (1994).
8. Baeuerle, P.A. & Baltimore, D. Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. *Cell* **53**, 211-217 (1988).
9. Whiteside, S.T. & Israel, A. I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin. Cancer Biol.* **8**, 75-82 (1997).
10. Perkins, N.D. The Rel/NF-kappa B family: friend and foe. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 434-440 (2000).
11. Ghosh, S., May, M.J. & Kopp, E.B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 225-260 (1998).
12. Simeonidis, S., Stauber, D., Chen, G., Hendrickson, W.A. & Thanos, D. Mechanisms by which IkappaB proteins control NF-kappaB activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 49-54 (1999).
13. Thompson, J.E., Phillips, R.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Ghosh, S. I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell* **80**, 573-582 (1995).
14. Whiteside, S.T., Epinat, J.C., Rice, N.R. & Israel, A. I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *EMBO J.* **16**, 1413-1426 (1997).
15. Parry, G.C. & Mackman, N. A set of inducible genes expressed by activated human monocytic and endothelial cells contain kappa B-like sites that specifically bind c-Rel-p65 heterodimers. *J. Biol. Chem.* **269**, 20823-20825 (1994).
16. SuYang, H., Phillips, R., Douglas, I. & Ghosh, S. Role of unphosphorylated, newly synthesized I kappa B beta in persistent activation of NF-kappa B. *Mol. Cell Biol.* **16**, 5444-5449 (1996).
17. Weil, R., Laurent-Winter, C. & Israel, A. Regulation of IkappaBbeta degradation. Similarities to and differences from IkappaBalpha. *J. Biol. Chem.* **272**, 9942-9949 (1997).
18. Tran, K., Merika, M. & Thanos, D. Distinct functional properties of IkappaB alpha and IkappaB beta. *Mol. Cell Biol.* **17**, 5386-5399 (1997).

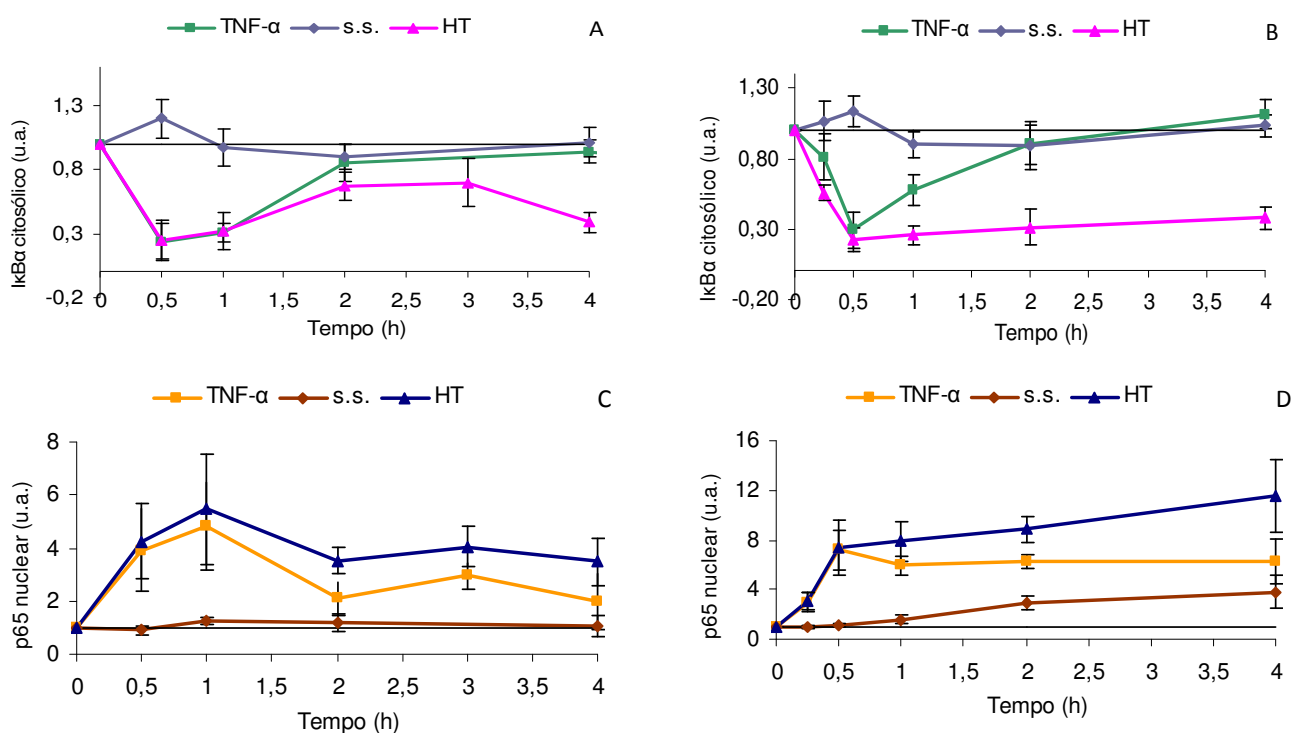
19. Arenzana-Seisdedos, F. *et al.* Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol. Cell Biol.* **15**, 2689-2696 (1995).
20. Sachdev, S., Bagchi, S., Zhang, D.D., Mings, A.C. & Hannink, M. Nuclear import of IkappaBalpha is accomplished by a ran-independent transport pathway. *Mol. Cell Biol.* **20**, 1571-1582 (2000).
21. Malek, S., Chen, Y., Huxford, T. & Ghosh, G. IkappaBbeta, but not IkappaBalpha, functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF-kappaB dimers by masking both NF-kappaB nuclear localization sequences in resting cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 45225-45235 (2001).
22. Lee, S.H. & Hannink, M. Characterization of the nuclear import and export functions of Ikappa B(epsilon). *J. Biol. Chem.* **277**, 23358-23366 (2002).
23. Lin, L. & Ghosh, S. A glycine-rich region in NF-kappaB p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit. *Mol. Cell Biol.* **16**, 2248-2254 (1996).
24. Spiecker, M., Darius, H. & Liao, J.K. A functional role of I kappa B-epsilon in endothelial cell activation. *J. Immunol.* **164**, 3316-3322 (2000).
25. Li, Z. & Nabel, G.J. A new member of the I kappaB protein family, I kappaB epsilon, inhibits RelA (p65)-mediated NF-kappaB transcription. *Mol. Cell Biol.* **17**, 6184-6190 (1997).
26. Schoonbroodt, S. *et al.* Crucial role of the amino-terminal tyrosine residue 42 and the carboxyl-terminal PEST domain of I kappa B alpha in NF-kappa B activation by an oxidative stress. *J. Immunol.* **164**, 4292-4300 (2000).
27. Brown, K., Gerstberger, S., Carlson, L., Franzoso, G. & Siebenlist, U. Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* **267**, 1485-1488 (1995).
28. Whiteside, S.T. *et al.* N- and C-terminal sequences control degradation of MAD3/I kappa B alpha in response to inducers of NF-kappa B activity. *Mol. Cell Biol.* **15**, 5339-5345 (1995).
29. Sun, S., Elwood, J. & Greene, W.C. Both amino- and carboxyl-terminal sequences within I kappa B alpha regulate its inducible degradation. *Mol. Cell Biol.* **16**, 1058-1065 (1996).
30. Van Antwerp, D.J. & Verma, I.M. Signal-induced degradation of I(kappa)B(alpha): association with NF-kappaB and the PEST sequence in I(kappa)B(alpha) are not required. *Mol. Cell Biol.* **16**, 6037-6045 (1996).
31. Hoffmann, A., Levchenko, A., Scott, M.L. & Baltimore, D. The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science* **298**, 1241-1245 (2002).
32. Kearns, J.D., Basak, S., Werner, S.L., Huang, C.S. & Hoffmann, A. IkappaBepsilon provides negative feedback to control NF-kappaB oscillations, signaling dynamics, and inflammatory gene expression. *J. Cell Biol.* **173**, 659-664 (2006).
33. Laskov, R., Berger, N. & Horwitz, M.S. Differential effects of tumor necrosis factor-alpha and CD40L on NF-kappaB inhibitory proteins IkappaBalpha, beta and epsilon and on the induction of the Jun amino-terminal kinase pathway in Ramos Burkitt lymphoma cells. *Eur. Cytokine Netw.* **16**, 267-276 (2005).
34. Schreck, R., Rieber, P. & Baeuerle, P.A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* **10**, 2247-2258 (1991).
35. Meyer, M., Schreck, R. & Baeuerle, P.A. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J.* **12**, 2005-2015 (1993).

36. Schreck,R. & Baeuerle,P.A. Assessing oxygen radicals as mediators in activation of inducible eukaryotic transcription factor NF-kappa B. *Methods Enzymol.* **234**, 151-163 (1994).
37. Oliveira-Marques,V., Cyrne,L., Marinho,H.S. & Antunes,F. A quantitative study of NF-kappaB activation by H₂O₂: relevance in inflammation and synergy with TNF-alpha. *J. Immunol.* **178**, 3893-3902 (2007).
38. Bowie,A. & O'Neill,L.A. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 13-23 (2000).
39. Antunes,F. & Cadenas,E. Cellular titration of apoptosis with steady state concentrations of H₂O₂: submicromolar levels of H₂O₂ induce apoptosis through Fenton chemistry independent of the cellular thiol state. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 1008-1018 (2001).
40. Bradford,M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
41. Laemmli,U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
42. Bjerrum & Schafer-Nielsen. Analytical Electrophoresis. 1986.
43. Dufresne-Martin,G., Lemay,J.F., Lavigne,P. & Klarskov,K. Peptide mass fingerprinting by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry of proteins detected by immunostaining on nitrocellulose. *Proteomics.* **5**, 55-66 (2005).
44. Gershoni,J.M. & Palade,G.E. Protein blotting: principles and applications. *Anal. Biochem.* **131**, 1-15 (1983).
45. ImageJ. 2008.
46. Jaspers,I., Zhang,W., Fraser,A., Samet,J.M. & Reed,W. Hydrogen peroxide has opposing effects on IKK activity and IkappaBalpha breakdown in airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **24**, 769-777 (2001).
47. Renard,P. *et al.* Inducible NF-kappaB activation is permitted by simultaneous degradation of nuclear IkappaBalpha. *J. Biol. Chem.* **275**, 15193-15199 (2000).
48. Johnson,D.R., Douglas,I., Jahnke,A., Ghosh,S. & Pober,J.S. A sustained reduction in IkappaB-beta may contribute to persistent NF-kappaB activation in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 16317-16322 (1996).
49. Fischer,C. *et al.* Differential effects of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor on monocytic IkappaB kinase signalsome activation and IkappaB proteolysis. *J. Biol. Chem.* **274**, 24625-24632 (1999).
50. Birbach,A. *et al.* Signaling molecules of the NF-kappa B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. *J. Biol. Chem.* **277**, 10842-10851 (2002).
51. Carlotti,F., Dower,S.K. & Qvarnstrom,E.E. Dynamic shuttling of nuclear factor kappa B between the nucleus and cytoplasm as a consequence of inhibitor dissociation. *J. Biol. Chem.* **275**, 41028-41034 (2000).
52. Baldwin,A.S., Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 649-683 (1996).
53. Thanos,D. & Maniatis,T. NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* **80**, 529-532 (1995).

54. Shishodia,S. & Aggarwal,B.B. Nuclear factor-kappaB: a friend or a foe in cancer? *Biochem. Pharmacol.* **68**, 1071-1080 (2004).
55. Chen,Y. *et al.* Inhibition of NF-kappaB activity by IkappaBbeta in association with kappaB-Ras. *Mol. Cell Biol.* **24**, 3048-3056 (2004).

VII. Anexo I

O trabalho desenvolvido nesta tese serviu para completar os trabalhos já efectuados por Oliveira-Marques *et al* (dados não publicados), em que se observou uma modulação do TNF- α pelo H₂O₂ na indução da degradação da subunidade I κ B α . Dado que a discussão dos dados apresentados nesta tese é sempre feita em paralelo com o observado previamente por Oliveira-Marques *et al*, apresentam-se os resultados obtidos para os valores citosólicos do I κ B α e nucleares da p65.



Varição dos níveis de I κ B α no citosol e p65 no núcleo em células HeLa e MCF-7, ao longo do tempo, induzida por TNF- α 0,37 ng/mL (■), [H₂O₂]_{s.s.} 25 μ M (♦) e ambos (▲). Análise quantitativa das bandas respeitantes ao I κ B α nas amostras citosólicas em células HeLa (A) e células MCF-7 (B) e à p65 nas amostras nucleares em células HeLa (C) e células MCF-7 (D), obtidas por *Western blot*, ao longo do tempo.